

Universitätsklinikum Rostock
Klinik für Neurologie

Direktor : Prof. Dr. Reiner Benecke

Untersuchungen zur Effektivität der Therapie mit einem komplexproteinfreien Botulinumtoxin A und zur Antikörperbildung gegen Botulinumtoxin A bei Spastikpatienten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

Vorgelegt von
Benjamin Frühling, geb. 08.08.1985 in Melle
18055 Rostock

Der Rat der Medizinischen Fakultät hat am 27.06.2011 den Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens geprüft und entschieden, ihn anzunehmen.

Eingang aller Gutachten am 15.11.2011.

Tag der Verteidigung am 07.12.2011.

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

Gutachter: Prof. Dr. Reiner Benecke, Klinik für Neurologie, Universität Rostock

Prof. Dr. Andreas Wree, Institut für Anatomie, Universität Rostock

Prof. Dr. Jörg Wissel , Neurologische Rehabilitationsklinik, Beelitz

Meinen Eltern, Großeltern und Freunden

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV

1 Einleitung..... 1

1.1 Das Botulinumneurotoxin (BoNT)..... 1

1.1.1 Geschichtliche Aspekte 1

1.1.2 Molekülstruktur 3

1.1.3 Pathophysiologie 5

1.1.4 Botulismus und Tetanus 10

1.1.5 Klinik des Botulismus 11

1.1.6 Therapie mit BoNTs 11

1.1.7 BoNT-Präparate..... 13

1.1.8 Vergleich der Wirksamkeit von Botox[®] und Dysport[®] - der Konversionsfaktor.... 16

1.1.9 Anwendungsgebiete 18

1.1.10 Zulassung von unterschiedlichen BoNT-Präparaten in Deutschland..... 20

1.1.11 Sicherheit und Nebenwirkungen 21

1.2 BoNT-Antigenität..... 23

1.2.1 Antikörperbildung 23

1.2.2 Mechanismen der Antikörper-vermittelten Toxinneutralisierung..... 25

1.2.3 Therapieversagen..... 27

1.3 Spastik 29

1.3.1 Definition und Klassifikation 29

1.3.2 Behandlung von Spastik-Patienten mit Botulinumtoxin 31

2 Zielsetzung	38
3 Material und Methoden	39
3.1 Patienten	39
3.2 Klinische Untersuchung	40
3.3. Ethik	41
3.4 Bestimmung von AK gegen BoNT-A mittels Maus Diaphragma-Test (MDT)	42
3.4.1 Reagenzien	42
3.4.2 Verbrauchsmaterialien	42
3.4.3 Geräte	43
3.4.4 Versuchstiere	44
3.4.4.1 Tierhaltung	44
3.4.4.2 Narkotisierung	44
3.4.4.3 Zwerchfellpräparation	44
3.4.5 Vorbereitung der Messapparatur	45
3.4.6 Herstellung der BoNT-Verdünnung	47
3.4.7 Messung der halbmaximalen Paralysezeit	47
3.4.8 Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve	49
3.4.9 Herstellung der Antikörper-Verdünnungen	49
3.4.10 Inkubation des Standardantikörperserums mit BoNT	49
3.4.11 Dialyse der Patientenseren	50
3.4.12 Bestimmung des AK-Titers in Patientenseren	50
3.4.12.1 Inkubation der Patientenseren mit BoNT	50

3.4.12.2 Messparameter.....	50
4 Ergebnisse	51
4.1 BoNT-Dosisfindung und Antikörperkalibrierungskurven für den MDT	51
4.1.1 Botulinumtoxin-A7-Dosis-Wirkungskurven.....	52
4.1.2 Antikörper-Kalibrierungskurve für Botulinumtoxin A7	53
4.2 Ergebnisse der Patientenuntersuchung	54
4.2.1 Antikörperbestimmung mit dem MDT.....	54
4.2.1.1 Ergebnisse des Nachweises von AK bei Spastikpatienten	54
4.2.1.2 Ergebnisse des Nachweises von AK bei Patienten mit cerebrovaskulärer Spastik	57
4.2.1.3 Ergebnisse des Nachweises von AK bei Dystoniepatienten	58
4.2.2 Klinische Ergebnisse der Xeomin®-Behandlung.....	61
4.2.2.1 Klinische Ergebnisse bei Spastikpatienten	61
4.2.2.2 Klinische Ergebnisse bei Dystoniepatienten	62
4.2.3 Korrelation der Ergebnisse des MDT mit der klinischen Response.....	62
4.3 Klinische Nebenwirkungen der Xeomin®-Behandlung.....	63
5 Diskussion	63
5.1 Methodendiskussion	63
5.1.2 Patientenbehandlung.....	65
5.2 Ergebnisdiskussion	65
5.2.1 Effektivität bei UMNS-Plus-Symptomatik	65
5.2.2 Nebenwirkung (nBoNT-AK-Bildung)	69

5.3 BoNT außerhalb der Zulassung.....	76
5.4 Ausblick.....	78
6 Zusammenfassung.....	80
7 Abbildungsverzeichnis.....	VII
8 Tabellenverzeichnis.....	VII
9 Literaturverzeichnis.....	VIII

Abkürzungsverzeichnis

ABTF	Antibody induced therapy failure
ACh	Acetylcholin
AK	Antikörper
AKTV	Antikörperinduziertes Botulinum-Toxin-Therapieversagen
AKTV-A	Antikörperinduziertes Botulinum-Toxin-A-Therapieversagen
aS	Spastik, anderer Ätiologie
AS	Aminosäure
BoNT	Botulinum-Neurotoxin
BT	Botulinum-Toxin, Gemisch aus Neurotoxin und nicht toxischen Proteinen
BoNT/A	Botulinumneurotoxin A
BT-A-AK	Spezifische Botulinum-Toxin-A-Antikörper
BT-AK	Botulinum-Toxin-Antikörper
BoNT/B	Botulinumneurotoxin B
BT-B-AK	Spezifische Botulinum-Toxin-B-Antikörper
BT-F	Botulinum-Toxin F
CD	Cervicale Dystonie
CNT	Clostridium-Neurotoxine
cS	Spastik, cerebrovasculär
DTT	Dithiothreitol
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EMG	Elektromyographie
ICP	Infantile Cerebralparese

IPT	Immunoprecipitations-Test
IU	International Units
kDa	Kilodalton
LD ₅₀	Halbmaximale Letaldosis im Maus-Letalitäts-Test, entspricht einer Mauseinheit
LK	Leichte Kette
Lsg	Lösung
M	Mol
mAK	Monoklonaler Antikörper
mAs	Modifizierte Ashworth-Scale
MDT	Maus-Diaphragma-Test
ME	Mauseinheit, entspricht der LD ₅₀ , differiert je nach Hersteller
MLT	Maus-Letalitäts-Test, je nach Hersteller unterschiedliche Bestimmungsverfahren
mN	Milli-Newton
MPA	Maus-Protektions-Assay
MS	Multiple Sklerose
MU-EV	Equivalence Mouse Units
nBoNT-AK	Neutralisierende BoNT-Antikörper
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, Kofaktor für die Vesikelfusion
pTV	Primäres Therapieversagen
SBA	Spezifische biologische Aktivität
S _C	C-terminale Domäne der SK
sCP	Spastische Cerebralparese
SD	Standardabweichung
SK	Schwere Kette
S _N	N-terminale Domäne der SK
SNAP-25	Synaptosomen associated protein, Protein des SNARE-Komplexes
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor, Vesikel-Fusions-Komplex
sTV	Sekundäres Therapieversagen
SV2	Synaptische vesikel Protein 2
t _{1/2}	Halbmaximale Paralysezeit
TV	Therapieversagen
U	Units
UMNS	Upper-Motoneuron-Symptomatik
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membran-Protein

1 Einleitung

1.1 Das Botulinumneurotoxin (BoNT)

1.1.1 Geschichtliche Aspekte

BoNT ist neben Plutonium die giftigste bekannte Substanz für den Organismus.

Gleichzeitig ist es eines der wenigen Stoffe, welches für die effektive Behandlung von Bewegungsstörungen im oberen Motoneuron eingesetzt werden kann.

Schon vor 400 Jahren wurde Botulinumtoxin erstmalig eingesetzt, als Gift.

Der indische Giftexperte „Schan aqua“ schrieb, dass wenn man den Darm eines Schafes mit Blut eines schwarzen Bullen fülle, ihn an beiden Enden zunähe und dann in den Schatten eines Maulbeerbaumes hänge und den Inhalt trocknen lasse, erhält man ein Gift, welches jeden Menschen innerhalb von 3 Tagen tötet (Bigalke et al. 2000).

Durch die schlechte wirtschaftliche Situation des späten 17. Jahrhunderts und die daraus resultierende Armut, welche durch den Napoleon-Krieg (1795-1813) entstanden war, wurde insbesondere in ländlichen Gebieten die Hygiene bei der Nahrungsmittelherstellung vernachlässigt. Dadurch kam es zu zahlreichen Ausbrüchen von Botulismus (Ting et al. 2004). Einer dieser Ausbrüche, welcher gut dokumentiert wurde, war 1793 in Wildbad bei Württemberg. Von den 13 involvierten Personen starben damals 9. Man vermutete die Quelle des Toxins in Bluträucherwürstchen. Das Wort „Botulus“ kommt aus dem lateinischen und heißt übersetzt „Würstchen“.

Die ersten wissenschaftlichen Aufzeichnungen über den Botulismus erschienen von dem deutschen Romanisten und Physiker Julius Kerner. Er wurde wegen seiner Experimente und seiner Stellung als Fachmann auch „Würst-Kerner“ genannt. In den Jahren 1817 und 1819 beschrieb er die ersten Fallstudien über Botulinumtoxinvergiftungen. Im Jahre 1822 schrieb er seine erste Analyse über das sog. „Fett-Gift“ in sauren Würstchen. In seinen Experimenten an

Tieren und waghalsigen Selbstexperimenten konnte er schon damals bis heute geltende, fundamentale Eigenschaften des Botulinumtoxins beschreiben. Er fand heraus, dass das Toxin nur unter anaeroben Bedingungen auftritt, dass es auf die Motoneuronen-Transmission wirkt und dass es schon in sehr kleinen Dosen tödlich ist. Auch konnte er schon alle auch heute noch gültigen klinischen Symptome beschreiben, inklusive der Todesursache (respiratorische Insuffizienz) und er erwähnte bereits, dass man das Toxin auch zu therapeutischen Zwecken einsetzen könne, z.B. bei der Chorea minor (Erbguth 2004).

Des weiteren erfand er symptomatische Therapiemaßnahmen, wie die elektrische Stimulation der Speicheldrüsen oder die erste dokumentierte erfolgreiche Magensonde.

Da zu dieser Zeit die mikroskopische Pathologie noch nicht zur Verfügung stand, vermutete Kerner, dass das Gift biologischen (tierischen) Ursprungs wäre und es im Fett produziert würde. Deshalb nannte er es auch Fett-Gift, Wurst-Gift oder Fett-Säure.

Den wahren Ursprung des Toxins entdeckte Dr. Emile Pierre van Ermengem (1851- 1922).

Er wurde unter Robert Koch in Berlin ausgebildet und isolierte den Erreger des Botulismus in gepökeltem Schweinefleisch, welches bei einer Beerdigung 1895 im belgischen Dorf Elezelles verspeist wurde und zu einem Botulismusausbruch führte (Gun et al. 1979; van Ermengem 1897).

Da es 1904 zu einem Ausbruch von Botulismus nach dem Verzehr von Dosenbohnen kam, wurde die bis dahin gültige Meinung revidiert, dass Botulinumtoxin nur in Dosenfleisch oder Dosenfisch vorkommt. Allerdings unterschieden sich die beiden Toxine voneinander. Erst 1919 wurden die serologischen Subtypen von Georgina Burke in Typ A und Typ B eingeteilt.

Die ersten klinischen Anwendungen von Botulinumtoxin beim Menschen wurden von Alan Scott und Edward Schantz 1968 durchgeführt. Scott hatte schon seit längerer Zeit vergeblich versucht, ein Mittel zu finden, um Muskelspasmen zu lindern, wie sie bei Strabismus oder Blepharospasmus auftreten.

Erst als Schantz ihm vorschlug, Botulinumtoxin zu verwenden, war er erfolgreich (Scott et al. 1973). 1978 gab auch die Food and Drug Administration in den USA die Erlaubnis, Botulinumtoxin Menschen zu injizieren (Klein 1996).

1.1.2 Molekülstruktur

Alle Clostridien-Neurotoxine gehören zu der sog. AB-Klasse. Das bedeutet, dass sie aus 2 verschiedenen Einheiten bestehen, wobei jede Einheit eine unterschiedliche Funktion besitzt. Die erste Einheit wird als sog. pharmakokinetische Einheit bezeichnet, sie sorgt dafür, dass die andere Einheit, die sog. pharmakodynamische Einheit an ihren Bestimmungsort gelangt, um dort die pathologische Wirkung zu entfalten.

Die pharmakokinetische Einheit wird auch als „schwere Kette“ bezeichnet, da sie ein höheres Molekulargewicht von 100 000 Da besitzt, wohingegen das Molekulargewicht der leichten Kette 50 000 Da beträgt. Ohne zusätzliche sogenannte Komplexproteine hat das BoNT also ein Molekulargewicht von 150 000 Dalton.

Ein Indiz dafür, dass es sich bei der leichten Kette um die pharmakodynamische Einheit handelt, ist das Vorhandensein von Zn^{++} . Dieses prädispositioniert die leichte Kette für enzymatische Prozesse als Metalloprotease.

Im Bakterienorganismus werden beide Ketten zunächst als inaktive Vorstufenketten produziert. Zur Aktivierung müssen die Ketten mittels Proteolyse gespalten werden. Als Verbindung zwischen den Ketten bleibt dann eine Disulfidbrücke und eine nicht-kovalente Bindung erhalten (aktives Gift mit einem Molekulargewicht von 150 000 Da) (Dolly et al. 2006).

Die Spaltung dieser beiden Ketten erfordert einen starken pH-Abfall, wie er in Endosomen gegeben ist. Bei einer Spaltung außerhalb der Präsynapse verliert das Neurotoxin seine Toxizität.

Alle kompletten BoNT-Serotypen enthalten zusätzlich Hämagglutinine und ein nicht-toxisches, nicht-hämagglutinierendes Protein. Diese Bestandteile werden als Komplexproteine bezeichnet. Sie ermöglichen dem BoNT die unzerstörte Aufnahme ins Blut über die Darmmukosa. Da Tetanustoxine diese Komplexproteine nicht besitzen, ist beim Tetanus eine orale Vergiftung nicht möglich.

In der dreidimensionalen Moleküldarstellung werden drei verschiedene Domänen erkennbar, eine katalytische, eine Bindungsdomäne und eine membranüberspannende Domäne. Die membranüberspannende Domäne umgibt das Enzym wie einen Gürtel. Das ganze Molekül ist aus α -Helix und β -Faltblattstrukturen aufgebaut.

Die Bindungsdomäne ist im C-terminalen Teil der schweren Kette lokalisiert und besteht aus 2 Subdomänen, von denen eine Ganglioside und die andere einen Proteinrezeptor bindet. Sie wird von der katalytischen Domäne durch die membranüberspannende (translocations) Domäne getrennt. Die membranüberspannende Domäne befindet sich im N-terminalen Teil der schweren Kette und ist für die Translokation des BoNT aus dem Endosom in das Zytosol der Präsynapse verantwortlich. Bei niedrigem pH führt die Transformation der α -Helix zu einer Veränderung der Endosomenmembran, so dass diese durchlässig für das Toxin bzw. die leichte Kette wird.

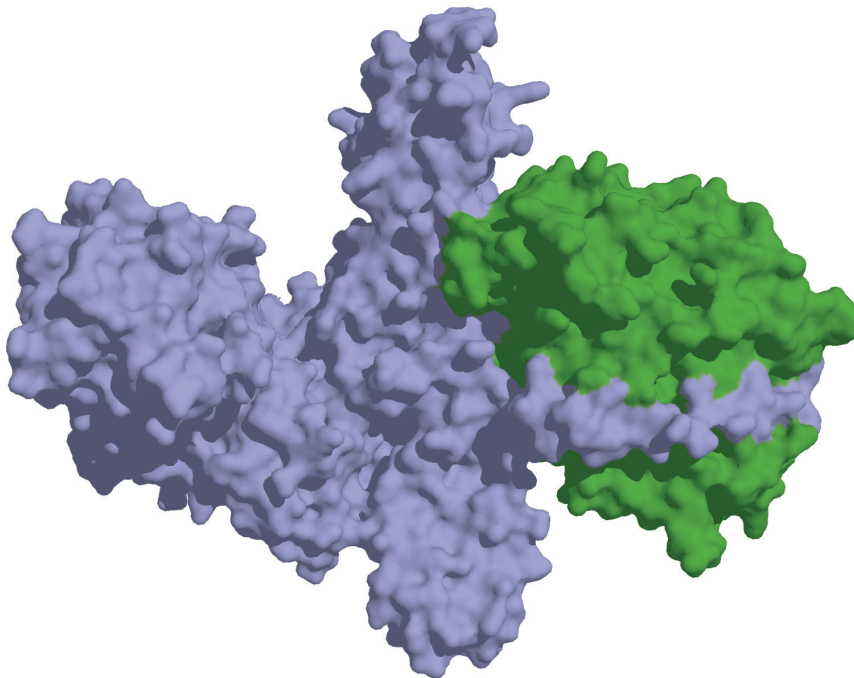


Abbildung 1: Molekülstruktur von BoNT/A. Blau: Schwere Kette, Grün: Leichte Kette (de.academic.ru)

1.1.3 Pathophysiologie

Alle Symptome des Botulismus basieren auf der Blockierung der cholinergen Synapsen an der neuromuskulären Endplatte oder im autonomen Nervensystem (Bigalke et al. 2000).

Dabei wird die Blockierung der Ca^{++} -getriggerten Neurotransmitter-Exozytose unterbunden.

Im physiologischen Zustand führt die Erregung an der Präsynapse der motorischen Endplatte zu einer spannungsabhängigen Öffnung von Ca^{++} -Kanälen. Das hat zur Folge, dass sich mit Acetylcholin (ACh) gefüllte Vesikel in der Präsynapse, welche mittels Halteproteinen in der Nähe der präsynaptischen Membran fixiert sind, durch den sogenannten SNARE-Komplex (siehe unten) noch dichter an die präsynaptische Membran anlagern. Wenn der Abstand zwischen der Phospholipiddoppelschicht der präsynaptischen Membran und der Vesikelmembran so gering ist, dass es energetisch vorteilhafter wird, in einen fusionierten Zustand überzugehen, kommt es zur Exozytose des Vesikelinhalts (Harbury 1998). Das ACh diffundiert in den synaptischen Spalt zu ACh-Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Die Bindung an die Rezeptoren führt zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran bzw. der Muskelfaser und damit zur Erregungsweiterleitung bzw. Kontraktion des Muskels. Das ACh wird durch eine Reduktase (ACh-Esterase) gespalten und das Cholin in die Präsynapse zurücktransportiert, wo es zur Resynthese von ACh kommt. Dieses steht für eine erneute Ausschüttung bereit.

Das BoNT greift nun in den Vorgang der Vesikelfusion inhibitorisch ein, wodurch die ACh-Ausschüttung verhindert wird.

Der gesamte Pathomechanismus kann daher in 3 Abschnitte unterteilt werden:

1. Rezeptorbindung und Internalisierung via Endozytose,
2. Translokation vom Endosom in das Zytosol der Präsynapse und
3. Spaltung von Zielstrukturen.

Das BoNT tritt in das Nervensystem auf der präsynaptischen Seite cholinergischer Synapsen ein (Wernick et al 1977; Dolly et al. 1984; Black and Dolly 1986a 1986b). Um in die Nervenzelle endozytiert zu werden, muss das BoNT an bestimmte, oben bereits erwähnte Membranbestandteile binden. Diese unterscheiden sich zwischen den einzelnen BoNT-

Serotypen. Sie bestehen einerseits aus Proteinrezeptoren, die für BoNT-A, -E und -F als das „synaptische vesikel Protein 2 (SV2)“ (Binz and Rummel 2009) und für BoNT-B und -G als „Synaptotagmin I/II“ identifiziert wurden. Die Proteinrezeptoren der Isotypen BoNT-C und -D sind noch nicht eindeutig identifiziert (Statmeier et al. 2010; Zhang et al. 2010).

Für die Endozytose werden zusätzlich Ganglioside als sog. neuronale Akzeptoren benötigt. Sie filtern das BoNT aus dem Interzellulärspalt und nähern es an die präsynaptische Membran an. SV2 und Synaptotagmin I/II werden vor allem nach einer Vesikelexozytose von ACh am entleerten Exosom gefunden. Der C-terminale Teil des Synaptotagmins befindet sich auf der zytosolischen Membranseite, während der N-terminale Teil in das Lumen des ACh-Vesikel hineinragt. An ihn binden BoNT-B und -G mit dem C-terminalen Teil, ihren schweren Ketten, während bei BoNT-A, -E und -F die Bindung an das SV2 in dessen Mittelabschnitt, und zwar an eine lange luminale Schleife, erfolgt. Anschließend kommt es zur rezeptorvermittelten Endozytose der BoNTs.

Wenn eine Erregung die Präsynapse erreicht und diese depolarisiert, ermöglicht der dadurch geänderte Protonengradient eine Konformationsänderung der BoNTs an ihren Disulfidbrücken. Unter Beteiligung der membranüberspannenden Translokationsdomäne wird ein Tunnel geformt, der die leichte Kette mit ihrer katalytischen Domäne aus dem Endosom ins Zytosol schleust. Eine zweite Möglichkeit besteht in der Einwirkung von Adenosintriphosphatase, die zu einer pH-Senkung im Endosom führt und damit ebenfalls die oben erwähnte Konformationsänderung auslöst.

Interessanterweise kann das BoNT seine inhibitorische Wirkung auch ohne neuronale Erregung entfalten, was aus dem Grunde schwer zu verstehen ist, dass sowohl für die Endozytose des BoNT in die Präsynapse als auch für die Freisetzung des BoNT aus dem Endosomen in das Zytosol der Präsynapse eine Erregung nötig ist. Die Einzelheiten dieses Vorganges sind daher noch nicht vollständig geklärt. Es wird aber vermutet, dass sich Synaptotagmin so umwandelt, dass eine Tasche entsteht, in der mehr SV2 gebildet wird und dadurch nur eine geringe Stimulation nötig ist, um viel Neurotoxin zu endozytieren.

Wenn man die leichte Kette in ein Liposom einbringt und dieses dann einer Maus ins Diaphragma injiziert, wird das Mausdiaphragma paralytisiert. Das beweist, dass allein die leichte Kette des BoNT zur Inhibition der Exozytose ausreicht.

Nicht geklärt ist bis heute, ob das komplette Toxin, inklusive Hüllproteine, ins Blut aufgenommen wird. Sicher ist allerdings, dass sich die Hüllproteine bei physiologischem pH vom reinen Toxin abspalten und über das Blut zu den motorischen Endplatten gelangen. Man vermutet, dass eine Konzentration zwischen 100 ng und 1000 ng im Blut für einen erwachsenen Menschen letal sind (Bigalke et al. 2000).

Bei der therapeutischen BoNT-Injektion in einen überaktiven Muskel dauert es ca. 12 Stunden, bis das Toxin an der neuromuskulären Endplatte angekommen ist. In der Vorderhornzelle kann man BoNT nach ca. 24 Stunden nachweisen. Dort führt BoNT allerdings zu keiner Hemmung der synaptischen Übertragung, im Gegensatz zum Tetanus-Neurotoxin (TeNT) (Pellizzari et al. 1999).

Im Zytosol angekommen, wird die leichte Kette durch die Thioredoxinreduktase freigesetzt. Die eigentliche toxische Wirkung der BoNTs beruht auf der selektiven proteolytischen Spaltung bestimmter Vesikelpoteine. Die leichten Ketten von BoNT und TeNT sind die bislang selektivsten bekannten Proteasen (Oost et al. 2003). BoNTs sind Zn^{++} -abhängige Endopeptidasen, die die bereits erwähnten SNARE-Proteine spalten. Diese sind für das Anlagern und die Fusion der ACh-haltigen Vesikel mit der präsynaptischen Membran verantwortlich. SNARE steht für "soluble NSF attachment protein receptors" und NSF bedeutet für N-ethylmaleimide sensitives Fusionprotein. Nach dem heutigen Wissensstand existiert ein vSNARE (vesicle SNARE), auch genannt Synaptobrevin, oder Vesicle associated membranprotein (VAMP). Es kommt vorwiegend in den Membranen der synaptischen Vesikel vor. Darüber hinaus gibt es zwei tSNAREs (target SNAREs), das syntaxin und das SNAP-25 (Synaptosome associated protein). Diese sind mit der Plasmamembran der Präsynapse verbunden und direkt an der Transmitterfreisetzung beteiligt. Während Synaptobrevin und Syntaxin eine eigene kleine C-terminale Einheit besitzen, die zur festen Membranverankerung dient, liegt SNAP-25 lockerer auf der Membran auf und wird über Palmitoyl an Cysteinresten der Plasmamembran gehalten (Veit et al. 1996).

Zur Einleitung der Transmitterfreisetzung bedarf es eines Ca^{++} -Einstroms in die Präsynapse. Das geschieht über spannungsgesteuerte Ca^{++} -Kanäle, die nahe der sogenannten aktiven Zone lokalisiert sind. Als aktive Zone bezeichnet man denjenigen Bereich, welcher intrazellulär vor der präsynaptischen Membran liegt. Nur hier findet die Vesikelfusion mit der Membran statt. Dazu müssen die Vesikel „markiert“ werden. Dabei wirkt das Synaptotagmin I, ein Ca^{++} -bindendes Protein als ein Calciumsensor. Wenn es zur Depolarisation der Synapse und damit

zu einem Ca^{++} -Einstrom kommt, führt dies zu einer Konformationsänderung im Synaptotagmin, was den Fusionsprozess einleitet.

Man geht ferner davon aus, dass sich unter dem Einfluss von Ca^{++} die in dem Vesikel enthaltenen vSNARES-Ausläufer mit den an der Membran der Präsynapse befindlichen tSNARES verbinden. Ohne Bindungspartner sind die SNARE-Proteine unstrukturiert (Fasshauer et al. 1997, Hazzard et al. 1999, Fiebrig et al. 1999). Erst nach Bindung mit entsprechenden Partnermolekülen entwickelt sich ein ternärer Komplex, welcher eine helikale Struktur annimmt (Sutton et al. 1998). Diese Struktur ist amphipathisch und gewunden. Sie wird mittels hydrophober Bindungen stabilisiert (Ossig et al. 2000).

Um den gebundenen Komplex stabil aufrecht zu erhalten sind noch andere Proteine nötig. Dazu gehören Munc18 (nSec1), Munc13 und Complexin (Misura et al. 2000; Dulubova et al. 2007; Tang et al. 2006; Basu et al. 2005).

Diese sehr stabile Struktur ist in der Lage, die Vesikelmembran so nah an die Phospholipid-Doppelschicht der präsynaptischen Membran zu bringen, dass eine Fusion die energetisch günstigste Variante ist (Fasshauer 2003).

Sobald der SNARE-Komplex gebildet wurde, verbindet sich ein N-ethylmaleimid-SNAP mit einem NSF, der dadurch aktiviert wird. Seine ATPase-Aktivität liefert durch Spaltung von ATP die nötige Energie, um den SNARE-Komplex zu dissoziieren und die ACh-Exozytose einzuleiten (Dolly et al. 2006).

BoNTs greifen genau an den SNARE-Komplexen an und verhindern durch Spaltung einzelner SNARE-Proteine deren Verbindung und damit die Transmitter-Exozytose. Dies muss geschehen sein, bevor sich die Einzelbestandteile zusammengelagert haben, da ein kompletter SNARE-Komplex vor der katalytischen Einheit der BoNTs geschützt ist. Hinsichtlich der Zielstrukturen unterscheiden sich verschiedene BoNT-Isoformen. Während die L-Kette des BoNT-B Synaptobrevin nur an Position Gln76 spaltet (an derselben Stelle wie TeNT), liegen die Schnittstellen für die Proteaseaktivität der L-Ketten von BoNT/D,F,G an verschiedenen Aminosäurepositionen des Synaptobrevins (Lys 59, Gln 58, Ala 81). Von BoNT/A werden neun Aminosäuren des C-Terminus von SNAP-25 abgespalten und von BoNT/E 26 Aminosäuren. Die L-Kette von BoNT/C1 spaltet als einzige katalytische Einheit zwei unterschiedliche Substrate, und zwar Syntaxin und SNAP-25.

Der SNARE-Komplex findet sich nicht ausschließlich in der Präsynapse von Motoneuronzellen und autonomen Nervenzellen, sondern z.B. auch in den Langerhanschen Zellen des Pankreas (zur Freisetzung des Insulins), in Zellen der Hypophyse (zur Freisetzung von Wachstumshormonen) sowie in Fett-Zellen, um den Glukosetransporter an die Membran zu bringen. Er kann daher auch in diesen Zellen durch verschiedene BoNT-Isoformen gehemmt werden.

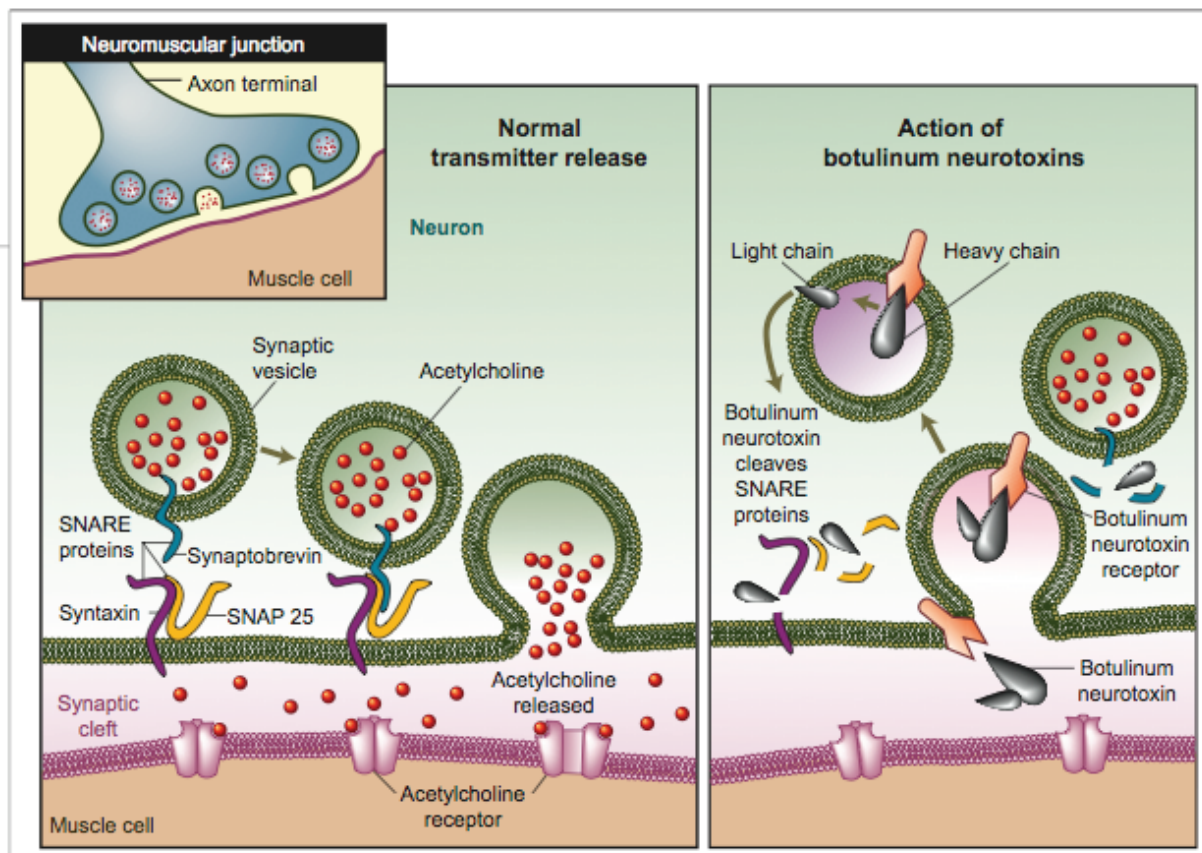


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der normalen Transmitterexozytose (links) sowie der Wirkung von BoNT an der motorischen Endplatte (rechts) (Dickerson and Janda 2006)

1.1.4 Botulismus und Tetanus

BoNTs werden von den Clostridien *C. botulinum*, *C. Barati* und *C. butyricum* unter anaeroben Bedingungen produziert. Die Bakterien benötigen zusätzlich eine proteinreiche Umgebung (Van Ermengem 1897).

Das *C. botulinum* ist ein stabförmiges, gram-positives, anaerobes Bakterium.

Bisher sind 7 wie bereits erwähnte BoNT-Serotypen bekannt, nämlich A, B, C1, D, E, F und G. Giftig für den Menschen sind nur die Toxine A, B und E. Die anderen Serotypen sind nicht humanpathogen, spielen aber eine Rolle bei Vergiftungen von Tieren, C1 z.B. bei Vögeln (Friend and Lock 1987).

Eine auffällige Eigenschaft der verschiedenen BoNTs ist ihre Heterogenität bezüglich der AS-Sequenzen. Die Übereinstimmung beträgt nur 30-40 %. Die größte Heterogenität der Sequenzen liegt in der C-terminalen Region der schweren Kette. Das mag die große Variabilität der einzelnen Serotypen bezüglich der Toxigenität bei verschiedenen Organismen erklären (Bigalke et al. 2000).

Es wird angenommen, dass sich die verschiedenen Serotypen phylogenetisch alle aus einem Urgen entwickelt haben. Bei der großen Vielfalt verschiedener Serotypen wird davon ausgegangen, dass das Toxin ursprünglich nicht gegen Säugetiere gerichtet war, sondern seine Exozytose-hemmende Wirkung in Prokaryonten entfaltete.

Für die Intoxikation von Säugetieren sind 3 Wege bekannt:

(1) Bei dem ersten Weg wird das Toxin außerhalb des Körpers produziert und gelangt über die vergiftete Nahrung in den Magen-Darm-Trakt. Vor der Magensäure und den Verdauungsenzymen ist es durch Komplexproteine, bestehend aus Hämagglutininen und nicht giftigen, nicht hämagglutinierenden Proteinen geschützt (Sugiyama 1980). Mittels der Hämagglutinine wird das Toxin dann durch die Mucosa des Darmes ins Blut aufgenommen.

(2) Bei einem zweiten Weg, welcher zum infantilen Botulismus führt, kann sich das Bakterium, nach Aufnahme über infizierte Speisen, in den unteren Darmabschnitten vermehren und dort BoNTs, wie BoNT-A bilden (Arnon 1980).

(3) Drittens kann *C. botulinum*, ähnlich wie *C. tetani* in schlecht oxyginierten Wunden Toxine synthetisieren.

1.1.5 Klinik des Botulismus

Die Klinik bei einer Intoxikation mit BoNTs ist für alle humanpathogene Serotypen gleich (Bigalke et al. 2000). Sie beruht auf der Inhibition der Exozytose des neuromuskulären Transmitters ACh an der Präsynapse der motorischen Endplatte. Nach Intoxikation vergehen 3-4 Tage bis zum Auftreten der ersten Symptome. Betroffen sind häufig stark innervierte Muskeln, wie z.B. die Augenmuskulatur. In schweren Fällen sind alle striatalen Muskeln einbezogen, so auch das Zwerchfell, was zum Tode durch Ersticken führen kann. Der Funktionsverlust der cholinergen autonomen Fasern führt darüber hinaus zu Mydriasis, Mundtrockenheit, Tachyarrhythmie und intestinaler Atonie.

Beim Tetanus handelt es sich im Gegensatz zum Botulismus um eine rhythmische spastische Kontraktionen der striatalen Muskeln.

Die Therapie beider Erkrankungen besteht in der Gabe von Muskelrelaxantien, gegebenenfalls Beatmung und intensivmedizinischer Überwachung. Auch die Gabe von Pferdeserumantikörpern ist in schweren Fällen indiziert (Bigalke et al. 2000).

1.1.6 Therapie mit BoNTs

Die heutigen therapeutisch verwendeten BT-Präparationen bestehen aus zwei Komponenten, dem BoNT und einem Arzneimittelträger.

Zusammen mit den bereits erwähnten Komplexproteinen besitzt das BoNT ein Molekulargewicht von 450 kD. Dabei können zwei BoNT Moleküle ein Dimer mit einem Molekulargewicht von 900 kD bilden (Dressler et al. 2007).

Von den 7 verschiedenen Serotypen werden nur zwei therapeutisch genutzt.

Klinisch unterscheiden sich die Serotypen vor allem durch ihre Wirkungsdauer.

Sie ist für BoNT/A mit durchschnittlich 28 Tagen am längsten (Meunier et al. 2003). BoNT/E wirkt nur knapp 5 Tage, obwohl es paradoxerweise mehr Aminosäuren spaltet als BoNT/A. Ein Hauptgrund für diesen Unterschied liegt darin, dass die leichte Kette des BoNT/A ein

Motiv besitzt, welches eine Sequestrierung an der Plasmamembran fördert und damit einen Abbau verzögert (Fernandez-Sales et al. 2004).

Ein weiterer Grund besteht in der Entstehung eines SNAP-25-Spaltproduktes, das durch Antagonisierung der Bindung des noch ungespaltenen SNAP-25 eine weitere Hemmung der Exozytose bewirkt (O'Sullivan et al. 1999).

BoNT-Präparate werden direkt in den zu paralyisierenden Muskel injiziert. Die Wirkungsweise ist im Muskel an der synaptischen Endplatte analog zur oben beschriebenen Pathophysiologie bei BoNT-Intoxikation.

Allerdings kommt es bald zu einem sogen. „Sprouting“ (Duchen 1971). Dabei handelt es sich um das Aussprossen von neuen Axonen und die Bildung neuer Synapsen. Das führt allerdings nicht, wie anfangs vermutet, zu einer Wirkungsabschwächung des BoNT und damit auch zu keiner Verstärkung der klinischen Beschwerden. Es handelt sich vielmehr lediglich um einen temporären Prozess, welcher nach einer Regenerierung der ursprünglich durch BoNT blockierten Synapse rückläufig ist (de Paiva et al. 1999).

BoNTs hemmen die ACh-Übertragung an der synaptischen Endplatte nur temporär. Sie schädigen oder zerstören die Nervenzelle und Synapse morphologisch nicht. Aus diesem Grund sollte laut Brin das BoNT auch nicht als Toxin bezeichnet werden, sondern eher als ein temporärer Neuromodulator (Brin et al. 2004).

Nach der intramuskulären Injektion von BoNT dauert es ca. 2-3 Tage, bis die Wirkung messbar ist (abhängig von der verwendeten Messmethode). Klinisch dauert es im Durchschnitt 4 Tage, bis die Patienten eine Relaxation der Muskulatur verspüren. Das Wirkungsmaximum ist nach 1-2 Wochen erreicht und hält ca. 2-3 Monate an. Die Wirkungsdauer kann durch physiotherapeutische Maßnahmen verlängert werden (Ward 2008). Allerdings fällt die Wirkungsstärke nach ca. 2,5 Monaten kontinuierlich ab. Bei einer Injektion von BoNT in autonom innervierte Drüsen hält die Wirkung deutlich länger an (im Durchschnitt 6-9 Monate) (Dressler et al. 2007).

Für klinische Studien, insbesondere zur Erfassung der BoNT-AK-Prävalenz sind daher außer einer Dosis-Wirkungs-Beziehung auch Dosis-Dauer-Beziehungen zu berücksichtigen (Dressler et al 2000).

Neben der Wirkung auf die striatale Muskulatur wurde auch eine BoNT-Wirkung auf das Spindelorgan im Muskel beschrieben, wobei der centripetale Informationsfluss gehemmt wird (Filippi et al 1993; Dressler et al 1993). Unklar ist allerdings, ob diese Blockade einen Einfluss auf die Wirksamkeit der BoNT-Therapie hat.

Eine zentrale Wirkung des BoNT nach Injektion in einen peripheren Muskel ist unwahrscheinlich (Wiegand 1976). Zwar kann das BoNT retrograd in Nerven transportiert werden, doch dauert dieser Vorgang so lange, dass das Neurotoxin, bevor es ins ZNS gelangt, abgebaut bzw. unwirksam geworden ist. Auch eine Blut-Hirn-Schrankenpassage ist aufgrund des hohen Molekülübergewichts (150 kD) nicht möglich (Dressler et al. 2007).

Bei der Injektion von BoNT in den Muskel kommt es immer zu einem minimalen Übertritt von BoNT in die Blutzirkulation. Symptomatisch dafür sind Faszikulationen in Muskeln, welche sich in der Nähe des injizierten Muskels befinden (Sanders 1986; Lange 1987; Olney 1988). Klinisch fällt dies allerdings nur dann auf, wenn sehr hohe Dosen verabreicht werden. Systemische Nebenwirkungen traten von allem bei Applikation von BoNT/B auf, wo schon eine mittlere Dosis genügt, um systemische Wirkungen auszulösen (Dressler et al. 2003).

Die Anwendungsgebiete der BoNT-Präparate haben sich in jüngster Zeit ständig erweitert.

Auch bei chronischen Schmerzzuständen, wie der Migräne, befinden sich BoNT-Präparate in der Erprobung (s.u.).

Durch ihre Wirkungsweise als Inhibitor cholinergischer Transmission, kann eine BoNT Injektion z.B. eingesetzt werden, um die cholinerge autonome Innervation zu hemmen. Daraus resultiert ihre Anwendung zur Unterdrückung der Überfunktion von Schweißdrüsen, Tränendrüsen und Speicheldrüsen (Dressler et al. 2007).

1.1.7 BoNT-Präparate

Zurzeit sind auf dem internationalen Markt 4 verschiedene BoNT-Präparate erhältlich. Botox[®] (Allergan, Irvine, CA, USA), Dysport[®] (Ipsen, Slough, Berks, UK), Neurobloc[®]/Myobloc[®] (Solstice Neurosciences, Malvern, PA, USA) und Xeomin[®] (Merz Pharmaceuticals, Frankfurt/M, Germany).

Alle BoNT/A-Präparate liegen in Pulverform vor und müssen mit 0,9% NaCl/H₂O-Lösung rekonstituiert werden. Nur Neurobloc[®]/Myobloc[®] (BoNT/B) wird als Flüssigkeit gelagert. Die meisten BoNT-Präparate müssen unter bestimmten Konditionen gekühlt aufbewahrt werden. Nur Xeomix[®] kann bei Zimmertemperatur gelagert werden. Die Verfallszeit ist für alle BoNT-Präparate gleich, so auch für Xeomin[®], obwohl die Lagerzeit von den Komplexproteinen, welche das BT stabilisieren, abhängig sein sollte.

Die Herstellung der medizinisch verwendeten BoNT-Präparate erfolgt ausschließlich biologisch. Dafür wird ein bestimmter Stamm von *C. botulinum* unter anaeroben Bedingungen bei optimalem pH auf Spezialnährböden gezüchtet. Nach ca. 36 Stunden hat die *C. botulinum*-Kultur ihr maximales Wachstum erreicht und setzt über zytolytische Prozesse eine BoNT-Vorstufe frei. Diese wird extrazellulär von bestimmten Proteasen aktiviert (siehe oben). Nach weiteren 72 Stunden hat die Kultur ihre maximale Toxinkonzentration erreicht und wird mittels Übersäuerung inaktiviert. Nach Zentrifugation wird das BoNT in einem speziellen Prozess gereinigt, wobei verschiedene Schritte, z.B. eine Ionen-Austauschchromatographie nötig sind. Nach der Reinigung liegt ca. die Hälfte des produzierten BoNT als steriles, hoch reines BoNT vor. Allerdings ist ein Teil dieses gereinigten BoNT durch den Reinigungsprozess inaktiviert worden. Die Reinheit des BoNT wird mittels Photometrie und Elektrophorese überprüft. Um eine gleichbleibende biologische Aktivität zu gewährleisten, wird jede Charge mittels Maus-Letalitäts-Test auf ihre Wirksamkeit geprüft und anschließend soweit verdünnt (in NaCl- oder Lactuloselösung), bis die gewünschte biologische Aktivität, gemessen in Mouse Units (MU), erreicht ist.

Obwohl eine international einheitliche MU angestrebt wird, sind die Messmethoden der verschiedenen Herstellerfirmen unterschiedlich. Deshalb ist es nicht ohne weiteres möglich, die verschiedenen Präparate in gleicher Weise zu dosieren. 1 MU Botox[®] hat eine ähnliche biologische Aktivität wie 3 MU Dysport[®] (s.u.). Eine MU Botox[®] und Xeomin[®] sind ungefähr gleich wirksam (Benecke 2005; Dressler et al. 2006).

Auch die vom Hersteller angegebene Effektivität der einzelnen BoNT-Präparate kann nicht ohne weiteres zur Grundlage der Dosiswahl verwendet werden. So scheinen die Effekte auf die Motoneuronen von Myobloc[®]/NeuroBloc[®] und Botox[®] in einem Verhältnis von 1:40 stehen.

Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen BoNT-Präparate und ihre wesentlichen Eigenschaften.

Tabelle 1: Eigenschaften der kommerziell erhältlichen BoNT-Präparate (modifiziert nach Dressler et al. 2007)

	Botox [®]	Dysport [®]	Xeomin [®]	NeuroBloc [®] Myobloc [®]
Hersteller	Allergan, Irvine, CA USA	Ipsen, Slough, Berks UK	Merz Pharmaceuticals, Frankfurt/M Germany	Solstice Neurosciences, Malvern, PA USA
Pharmazeutische Präparation	Pulver	Pulver	Pulver	Fertiglösung
Lagerungsbedingungen	Unter 8°C	Unter 8°C	Unter 25°C	Unter 8°C
Haltbarkeit	24 Monate	15 Monate	36 Monate	24 Monate
BoNT Typ	A	A	A	B
C. botulinum Stamm	Hall A	Ipsen	Hall A	Bean B
SNARE Ziel	SNAP 25	SNAP 25	SNAP 25	VAMP
Reinigungsprozess	Ausfällung und Chromatographie	Ausfällung und Chromatographie	Ausfällung und Chromatographie	Ausfällung und Chromatographie
pH Wert der rekonstituierten Präparation	7.4	7.4	7.4	5.6
Stabilisierung	Vakuumtrocknung	Gefriertrocknung	Vakuumtrocknung	pH-reduktion
Bindemittel	Humanes Serum Albumin 200 µg/Ampulle NaCl 900	Humanes Serum Albumin 125 µg/Ampulle Lactose 2500	Humanes Serum Albumin 1 mg/Ampulle Saccharose	?

	µg/Ampulle	µg/Ampulle	5mg/Ampulle	
Biologische Aktivität	100 MU-A/ Ampulle	500 MU-I/ Ampulle	100 MU-M/ Ampulle	1.0/2.5/10.0 k MU-E/ Ampulle
Biologische Aktivität im Vergleich zu Botox®	1	1/3	1	1/40
Spezifische biologische Aktivität	60MU- EV/ngBNT	100MU- EV/ngBNT	167MU- EV/ngBNT	5MU- EV/ngBNT

Abkürzungen: BNT, Botulinumneurotoxin; MU-A, mouse unit in dem Allergan-Maus-Letalitäts-Test; MU-E, mouse unit in dem Solstice-Maus-Letalitäts-Test; MU-I, mouse unit in dem Ipsen-Maus-Letalitäts-Test; MU-M, mouse unit in dem Merz-Maus-Letalitäts-Test; MU-EV, äquivalente Maus-Units, 1 MU-EV= 1MU-A = 1MU-M = 3MU-I = 40MU-E

1.1.8 Vergleich der Wirksamkeit von Botox® und Dysport® - der Konversionsfaktor

Randomisierte, kontrollierte Studien, in welchen die beiden BoNT/A-Präparate Botox® und Dysport® verglichen wurden, sind an Patienten mit Blepharospasmus, cervicaler Dystonie (CD), spasmodischer Dysphonie und Achalasie durchgeführt worden. Im Ergebnis zeigte Dysport® zwar eine höhere Effektivität und eine längere Wirkungsdauer, sie ging allerdings mit einer höheren Rate an Nebenwirkungen einher (Sampaio et al. 2004).

Bei dem Vergleich dieser beiden Präparate muss der sog. Konversionsfaktor berücksichtigt werden. Er beschreibt die unterschiedliche biologische Aktivität der Präparate. In mehreren Studien wurde versucht, den Konversionsfaktor für den Vergleich von Botox® und Dysport® zu ermitteln, z.B. bei der Behandlung des Blepharospasmus (Nussgens et al. 1997), des Hemispasmus facialis (Sampaio et al. 1997) und der spasmodischen Dysphonie (Whurr et al. 1995). Ein Problem dieser Studien besteht darin, dass diese Krankheitsbilder sehr dosis-insensitiv sind, um eine gute Wirkung zu erzielen (Rosales et al. 2006). Hier wäre ein besseres Modell mit der CD gegeben.

Eine Studie an Patienten mit CD sprach für einen Konversionsfaktor von 1:3 bis 1:2 (Ranoux et al. 2002).

In einer Studie an gesunden Freiwilligen wurde die Wirkung mittels Elektroneurographie objektiv bewertet. Interessanterweise war hier der Konversionsfaktor mit 1.57 Einheiten Dysport® zu einer Einheit Botox® deutlich niedriger (Wohlfahrt et al. 2008).

Zusätzlich wurde in dieser Studie beobachtet, dass Nachbarmuskeln mitbetroffen waren. Hier hielt die Wirkung allerdings nicht so lange an wie im Hauptmuskel. Eine Verdopplung der Konzentration hatte paradoxerweise eine geringere Wirkung auf die Nachbarmuskulatur. Das lag vermutlich daran, dass das Injektionsvolumen sich halbierte und damit die Verteilung im Gewebe verminderte (Wohlfarth et al. 2008).

Im Umkehrschluss bedeutet das, dass je verdünnter das BoNT ist, desto stärker es in Nachbarmuskeln aufgrund des größeren Injektionsvolumens wirkt.

Nach anderen Studien sind Nebenwirkungen der BoNT-Behandlung der CD, vor allem die Schluckstörungen, welche bei Dysport® häufiger auftreten, eher eine Konsequenz einer zu hohen Dosierung aufgrund eines falschen Konversionsfaktors als präparatbedingt (Dressler 2002).

Komplexproteinfreies BoNT/A (Xeomin®) unterscheidet sich nach bisherigen Erfahrungen bei der Behandlung der CD in der Wirksamkeit nicht von Botox® und Dysport® (Wohlfarth et al. 2007). Das lässt darauf schließen, dass die Gewebediffusion des BoNTs nicht wesentlich von den Komplexproteinen beeinflusst wird. Dies kann daran liegen, dass bei physiologischem pH die Komplexproteine abgespalten werden und die Toxinmoleküle separat in den Zielmuskel und die Nachbarmuskeln diffundieren (Wohlfarth et al. 2007). Bisher liegen allerdings für die Anwendung des komplexproteinfreien Xeomin® nur beschränkt klinische Erfahrungen vor. Das gilt insbesondere für die Behandlung der Spastik.

1.1.9 Anwendungsgebiete

Seit der offiziellen Freigabe von BoNT durch die FDA wurden wegen seiner Wirkungsweise als irreversibler Inhibitor cholinergischer Transmission sämtliche Krankheitsbilder, welche durch eine erhöhte ACh-Ausschüttung (glanduläre Hyperfunktionen, hypertone Bewegungsstörungen) bedingt sind, sowie klinische Symptome hypercholinergischer Zustände als Anwendungsgebiete in Betracht gezogen.

Die ersten Studien hierzu wurden zwischen 1981 – 1988 durchgeführt. Darunter befanden sich auch die ersten placebokontrollierten Doppelblindstudien, so von Tsui et al. (1986) beim Torticollis spasmodicus, von Jankovic et al. (1987) bei fokaler Dystonie und von Brin et al. (1988) beim Spasmus hemifacialis und bei spasmodischer Dysphonie. In allen Fällen konnte die Effektivität von Botulinumtoxin bestätigt werden.

Häufige Indikationen der BoNT-Therapie sind heute die CD, der Blepharospasmus und der Spasmus hemifacialis. In den letzten Jahren folgten über 60 weitere Indikationsmöglichkeiten. Hierdurch wurde das BoNT auch in anderen Fachrichtungen als Therapeutikum eingeführt, wie z.B. in der Ophthalmologie, Pädiatrie, Inneren Medizin, Urologie, Dermatologie und Chirurgie.

Die Welterstzulassung für Botox® für die Indikation Spastizität erfolgte 2001 in der Schweiz. Einige Anwendungsgebiete kamen durch Zufallsbeobachtungen hinzu. So wurde z.B. bei der Behandlung vom Blepharospasmus beobachtet, dass eine starke Reduktion der Stirnfalten auftrat. Hierdurch wurde die kosmetische Verwendung von BoNT eingeleitet. Heutzutage zählt diese zum größten Absatzmarkt der BoNT-Präparate (Scott 2004).

In der Folge wurden auch positive Effekte auf Migräne-Attacken beobachtet (Binder et al. 2000). Damit eröffnete sich das relative neue Anwendungsgebiet der Schmerzreduktion (Benecke et al. 2003). Ob dem Effekt der Schmerzreduktion eine sekundäre Reaktion auf die Muskelrelaxation oder eine direkte analgetische Wirkung zu Grunde liegt, konnte bisher noch nicht sicher geklärt werden.

Weitere Indikationen der BoNT-Therapie könnten sich aus einem antiinflammatorischen Effekt ergeben (Borodic et al. 2001). Hieraus wird deutlich, dass das Indikationsspektrum des BoNT noch erweiterungsfähig ist und weitere Indikationen in den nächsten Jahren hinzu kommen werden.

Tabelle 2 fasst die derzeit anerkannten Indikationen für die BoNT-Therapie zusammen.

Tabelle 2: Klinische Anwendungsgebiete von BoNT (modifiziert nach Homann et al. 2002 und Charles 2004)

Okulomotorische Bewegungsstörungen	<ul style="list-style-type: none"> - Strabismus - Nystagmus - Blepharospasmus
Nichtdystone unwillkürliche Bewegungsstörungen	<ul style="list-style-type: none"> - Spasmus hemifacialis - Tremor - Tics - Myokymie - Myoklonien - Kongenitale Muskelkrämpfe
Cervicale Dystonie	<ul style="list-style-type: none"> - Torticollis spasmodicus - Retrocollis - Laterocollis - Kombinationen
Andere fokale Dystonien	<ul style="list-style-type: none"> - Extremitätendystonien (z.B. Schreibkrampf) - Spasmodische Dysphonie - Temporomandibuläre Dystonie
Spastische Bewegungsstörungen	<ul style="list-style-type: none"> - ZNS-Trauma - Schlaganfall - MS - Zerebralparese
Hydrationsstörungen	<ul style="list-style-type: none"> - Prim. axilläre Hyperhidrose - Frey's Syndrom - Krokodilstränen - Sialorrhoe
Hyperaktivität der glatten Muskulatur	<ul style="list-style-type: none"> - Detrusor Sphincter Dyssynergie - Achalasie - Chronische Analfissur
Chronische Kopfschmerzen	<ul style="list-style-type: none"> - Migräne - Spannungskopfschmerz
Muskuloskeletale Schmerzen	<ul style="list-style-type: none"> - Chronische Rückenschmerzen - Myofasciale Schmerzen und Spasmen - Cervicogene Kopfschmerzen
Kosmetische Anwendung	<ul style="list-style-type: none"> - Faltenreduktion

1.1.10 Zulassung von unterschiedlichen BoNT-Präparaten in Deutschland

Jedes der vier in Deutschland verwendeten BoNT-Präparate hat eigene individuelle Zulassungsbeschränkungen. Die seit längerem in Deutschland zugelassenen Indikationen für eine Therapie mit BoNT bzw. als Therapeutikum der ersten Wahl sind der Blepharospasmus, der Spasmus hemifacialis und die CD. In jüngerer Zeit hinzugekommene Indikationen sind die Spastik der oberen Extremität, die infantile Zerebralparese, die Hyperhidrose und die kosmetischen Behandlung von Stirnfalten (Ceballos-Baumann 2010).

Der Einsatz von BoNT-A ist in Deutschland für alle drei auf dem Markt befindlichen Präparate uneingeschränkt für die Indikationen Blepharospasmus, Torticollis spasmodicus und die kosmetische Behandlung der Glabellafalte zulässig. Für die anderen zugelassenen Indikationen gibt es individuell spezifizierte Einschränkungen. Das gilt insbesondere für die Spastik (s. Tab 3).

Tabelle 3: Zugelassene Indikationen für die Behandlung mit BoNT-Präparaten in Deutschland (modifiziert nach Caballos-Baumann 2010)

Xeomin [®] (Stand 12/09)	Botox [®] (Stand 04/09)	Dysport [®] (Stand 06/09)	Neurobloc [®] (Stand 02/08)
Blepharospasmus	Blepharospasmus	Blepharospasmus	
	Hemifacialer Spasmus und koexistierende fokale Dystonien	Hemifacialer Spasmus und koexistierende fokale Dystonien	
Cervikale Dystonie mit überwiegend rotatorischer Komponente (Torticollis spasmodicus) bei Erwachsenen	Cervikale Dystonie (Torticollis spasmodicus)	Cervikale Dystonie (Torticollis spasmodicus)	Cervikale Dystonie (Torticollis spasmodicus)
Spastik der <u>oberen</u> Extremitäten nach Schlaganfall mit Handgelenkbeugung und gefausteter Hand bis 400 U / Sitzung	Fokale Spastizität mit – Spitzfuß bei ICP-Patienten - des Handgelenks und der Hand bei erwachsenen Schlaganfallpatienten bis 240 U / Sitzung Hyperhidrosis axillaris	Armspastik bei Erwachsenen infolge eines Schlaganfalls insgesamt 1000 U / Sitzung	
Glabellafalte	Glabellafalte	Glabellafalte	

So ist Botox[®] für die Behandlung der Spastizität des Handgelenks, der Hand und der Finger beim erwachsenen Schlaganfallpatienten und Dysport[®] für die symptomatische Behandlung der Armspastik bei Erwachsenen infolge Schlaganfalls zugelassen. Botox[®] ist das einzige Präparat, welches die zusätzliche Zulassung zur Behandlung der unteren Extremität (Spitzfuß) von Kindern (nach ICP) hat. Das jüngste Präparat auf dem Markt ist Xeomin[®] von der Firma Merz Pharmaceuticals GmbH. Seine Zulassung zur Behandlung der Spastik der oberen Extremität nach Schlaganfall mit Handgelenkbeugung und gefausteter Hand wurde Ende 2009 erteilt (Wissel 2010). Sie basiert auf den Ergebnissen der größten randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie, die mit BoNT bisher bei Spastik der oberen Extremität nach Schlaganfall durchgeführt wurde (Kanovsky P et al. 2009).

1.1.11 Sicherheit und Nebenwirkungen

Nebenwirkungen bei der Anwendung von BoNT in der Muskulatur sind relativ selten. Sie können in drei Formen unterteilt werden: Obligate, lokale und systemische Nebenwirkungen (Dressler et al. 2007).

(1) Die obligaten Nebenwirkungen sind auf die Verabreichungsform zurückzuführen und nicht völlig zu vermeiden. So können bei der Injektion des BoNT in den Muskel kleinere, z.B. subkutane Blutungen entstehen, die beim Blepharospasmus bisweilen ein kosmetisches Problem darstellen.

(2) Lokale Nebenwirkungen kommen durch die Diffusion des BoNT vom injizierten Muskel in benachbarte Muskeln und andere Gewebe zustande.

(3) Systemische Nebenwirkungen kommen nur nach Applikation sehr hoher BoNT-Dosen vor und resultieren aus dem Übertritt von BoNT-Molekülen in das Blut. Auf Grund ihrer Größe können diese Moleküle aber die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren, weshalb zentralnervöse Nebenwirkungen bisher nur nach versehentlicher intrathekalen BoNT-Applikation beschrieben wurden.

Die Nebenwirkungen treten zumeist innerhalb einer Woche auf und halten dann noch ca. 1-2 Wochen an. Ihr Auftreten und ihre Stärke hängen vor allem von der applizierten Dosis ab (Dressler et al. 2007).

Langzeitnebenwirkungen wurden seit dem Beginn der BoNT-Therapie im Jahre 1980 nicht dokumentiert.

In seltenen Fällen kam es zu BoNT-getriggerten Brachioplexopathien. Doch selbst in diesen Fällen konnte die Behandlung mit BoNT fortgesetzt werden, da ein Wiederauftreten nach Reinjektion extrem selten war (Probst et al. 2002).

Eine Kontraindikation für die BoNT-Applikation stellt die Schwangerschaft dar. Zwar wurde noch kein Fall beschrieben, in dem versehentliche BoNT-Injektionen in der Schwangerschaft zu einer Fruchtschädigung oder zu einer Fehlgeburt geführt hätten, doch sollte aufgrund einer potentiellen Paralyse des Uterus-Muskels auf die BoNT-Therapie verzichtet werden.

Vorsicht ist geboten mit BoNT-Injektionen bei Patienten mit vorbestehenden Paralysen, wie z.B. bei ALS, Myopathie, Polyneuropathie, Myasthenia gravis und Lambert-Eaton-Syndrom (Erbguth et al. 1993).

Auch die Kombination von BoNT mit Aminoglykosid-Antibiotika führte zu einer verstärkten Muskelparalyse. Hier sind allerdings Nutzen und Schaden der Medikamentenkombinationen im individuellen Fall abzuwägen (Dressler et al. 2007).

Beim Vergleich der Nebenwirkungsrate der verschiedenen BoNT-Präparate fällt auf, dass alle Präparate zwar die gleichen Nebenwirkungen verursachen können, die Häufigkeit ihres Auftretens jedoch variiert. So ist die Nebenwirkungsrate von Dysport® im Vergleich zu Botox® höher (Dressler 2002).

Die Gründe sind noch unklar. Sie könnten allerdings mit der erhöhten Diffusion von Dysport® zu tun haben. Darauf weisen jedenfalls Tierexperimente hin (Brin et al. 2004) (Siehe auch 1.1.8).

Die Nebenwirkungsrate von Xeomin® und Botox® ist in Übereinstimmung mit dem Konversionsfaktor 1 identisch (Benecke et al. 2005; Dressler et al. 2006).

BoNT-B-Präparate weisen eine deutlich höhere Nebenwirkungsrate im autonomen Nervensystem auf als BoNT-A-Präparate. Selbst kleine Mengen von BoNT-B führen in vielen Fällen zu Mundtrockenheit, Corneaentzündungen, Akkomodationsstörungen oder nasalen und genitalen Irritationen. Da die Nebenwirkungen bei Injektionen in unterschiedlichen Zielregionen auftreten, kann man davon ausgehen, dass es sich um systemische Effekte handelt (Dressler et al 2007).

Warum BoNT-B eine stärkere Wirkung auf autonome Neurone und eine schwächere Wirkung auf motorische Neurone ausübt als BoNT-A, ist bis heute unklar.

Aufgrund seines Nebenwirkungsprofils sollte BoNT-B möglichst keinem Patienten mit vorbestehenden autonomen Erkrankungen oder in Verbindung mit Anticholinergika appliziert werden bzw. die Applikation unter strenger Kontrolle stehen.

Generell sollten BoNT-B Präparate in diesen Fällen nur als Ultima ratio, z.B. bei einem Antikörper-bedingten Therapieversagen gelten (siehe 1.2.3.).

Ob BoNT-B Präparate zur Behandlung autonomer cholinergischer Hyperaktivität besser geeignet sind als BoNT-A-Präparate, ist bislang nicht geklärt (Dressler et al. 2007).

1.2 BoNT-Antigenität

1.2.1 Antikörperbildung

Seit dem Beginn der BoNT-Therapie gab es Fälle von Therapieversagern. Häufige Ursache war das Auftreten von neutralisierenden oder blockierenden Antikörpern, die zu einem sogenannten Antikörper induzierten Therapieversagen (ABTF – Antibody-induced therapy failure) führten (Dressler et al. 2007).

Dieses Phänomen ist kein Novum. Es ist von zahlreichen Therapien mit spezifischen Proteinen, wie z.B. Insulin, Interferon β , Erythropoetin α oder Wachstumshormonen bekannt (Schellekens 2005).

Bei der BoNT-Therapie führen jedoch nicht alle Antikörper zu einem Therapieversagen, z.B., wenn sie gegen die nicht-toxischen Komponenten des BoNT gerichtet sind und dann als nicht-neutralisierende Antikörper bezeichnet werden.

Risikofaktoren für das Auftreten von Antikörpern hängen von der Menge des applizierten BoNT bei jeder Injektion und von dem Intervall zwischen den einzelnen Injektionen ab (Dressler et al. 2000). Die zu applizierende Dosis ist allerdings nach unten begrenzt, da eine ausreichende Paralyse des Muskels erreicht werden muss. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass auch die immunologische Potenz des BoNT-Präparates einen Risikofaktor darstellt (Dressler 2009).

Dabei spielt die biologische Aktivität des BoNT-Präparates keine Rolle, sondern nur die humorale Immunreaktivität des Patienten.

Zu einem Therapieversagen kommt es natürlich auch, wenn das BoNT-Präparat durch die Herstellung oder Lagerung inaktiviert wurde. Dies beruht auf Konformationsänderungen (Dressler et al. 2007). Auch inaktiviertes BoNT kann zu einer Bildung von Antikörpern führen. Die Qualität des BoNT-Präparates ist ein wichtiger Risikofaktor für die Antikörperbildung und damit für ein ABTF. Hohe Qualität eines BoNT-Präparates bedeutet, dass der Anteil des inaktivierten BoNT und seine Antigenität niedrig sind und daraus eine hohe biologische Aktivität resultiert. Im Umkehrschluss sind bei niedriger Qualität eines BoNT-Präparates der Anteil von inaktiviertem BoNT und seine Antigenität hoch und dadurch die biologische Aktivität niedrig (Dressler et al. 2007).

Die immunologische Qualität eines BoNT-Präparates korreliert also mit seiner spezifischen biologischen Potenz. Diese wird üblicherweise mit dem MLT bestimmt und in MU/ng BoNT angegeben. Sie variiert erheblich zwischen den einzelnen BoNT-Präparaten. Entsprechend haben die einzelnen Präparate eine unterschiedliche Proteinladung („Protein Load“) bei gleicher Wirksamkeit. Sie wird in ng BoNT/MU angegeben.

Die Entwicklung von Antikörpern gegen die einzelnen Präparate wird im Endeffekt durch zahlreiche Faktoren beeinflusst bzw. begünstigt (Atassi 2004):

- 1: Intrinsische Faktoren der Proteine (Größe, Beschaffenheit, Untereinheiten).
- 2: Das Vorhandensein von Fremdproteinen, die immunologische Reaktionen verstärken und damit als Adjuvantien wirken.
- 3: Das Vorhandensein von denaturierten Antigenen, das auf einer Veränderung der Oberflächen beruht, die weitere Angriffsstellen für Antikörper hervorbringt.
- 4: Das Vorhandensein von polymerisiertem Antigen.
- 5: Veränderungen der covalenten Strukturen (Beispiel: Spaltung der Disulfidbrücke).

Als Risikofaktoren für das ABTF kommen von Patient zu Patient unterschiedliche individuelle Faktoren hinzu.

Dazu zählen die Immunkompetenz des Gewebes, in welches injiziert wird, das Patienten-Geschlecht und die Reagibilität des gesamten Immunsystems (Dressler 2000; Dressler 2004).

Die kumulative Dosis, die Dauer der Behandlung und das Alter der Patienten wurden häufig als unwichtige Risikofaktoren betrachtet, da das Auftreten von Antikörpern auch nach mehr als 14 Injektionsserien selten war (Dressler 2000). Diese Faktoren werden aber der Vollständigkeit halber in dieser Arbeit ebenfalls berücksichtigt.

1.2.2 Mechanismen der Antikörper-vermittelten Toxinneutralisierung

Die Mechanismen der Toxinneutralisierung von BoNT beruhen auf einer Bindung von Antikörpern an seine einzelnen Komponenten. Wie bereits erwähnt, besteht das BoNT aus einem toxischen Protein und aus mehreren nicht-toxischen Proteinen. Gegen jedes dieser Proteine kann das Immunsystem des Empfängerorganismus reagieren. Alle Proteinkomponenten besitzen also eine immunologische Potenz. Auch bei therapeutisch eingesetzten BoNT-Dosierungen kann es zu einer Immunisierung kommen, was zu dem erwähnten ABTF führt (Atassi et al. 2005). Studien haben ergeben, dass sowohl die Sn- als auch die Sc-Subdomäne von B- und T-Lymphozyten erkannt werden und diese stimulieren können (Atassi and Oshima 1999, Atassi and Dolimbek 2004, Dolimbek et al. 2005).

Antikörper können in alle drei Schritte des Pathomechanismus von BoNT hemmend eingreifen. Durch Sc-Antikörper kann die Bindung des BoNT an die Zelle und seine Internalisierung behindert werden, die Sn-Antikörper können die Translokation des BoNT hemmen und LK-Antikörper hemmen die enzymatische Aktivität.

Es wurde auch ermittelt, dass es eines gewissen Titers bedarf und nur bestimmte Isotypen, welche eine hohe Affinität zu den Zielproteinen besitzen, eine Neutralisierung des BoNT bewirken (Atassi et al 2004).

Der potenteste Effekt im Rahmen der Neutralisierung des BoNT wird durch die Blockierung der SK-Domäne (Translokationsdomäne) ausgelöst (Amersdorfer et al. 1997, Novakowski et al. 2002, Marks 2004, Tavallaie et al. 2004). Dennoch wären Antikörper gegen die S_C oder S_N-Subdomäne bzw. gegen die LK-Domäne allein nicht in der Lage, BoNT zu neutralisieren. Anti-S_C-Antikörper zeigten allerdings in sehr hohen Dosen eine neutralisierende Wirkung (Amersdorfer et al. 1997). Durch Kombination der S_C-Antikörper mit den S_N-Antikörpern kommt es zu einem höheren Blockierungseffekt. Doch auch dieser ist geringer als der von kompletten Anti-SK-Domäne-Antikörpern (Amersdorfer et al. 1997). Die Immunisierung mit

der SK-Domäne führte zur höchsten Induktionsrate von Antikörpern (Travallaie et al. 2004). Die Kombination aus drei monoklonalen Antikörpern führte zu der höchsten Neutralisierungsrate. Die Antikörper besitzen eine sehr hohe Bindungsaffinität zu den Epitopen des BoNT und haben dadurch eine 100-mal höhere Potenz als polyklonales Humanimmunglobulin (Nowakowski et al. 2002, Marks 2004).

Nach absichtlicher Immunisierung mit BoNT wurden im Serum zahlreiche LK-Antikörper nachgewiesen, die alleine keinen Neutralisierungseffekt auslösten (Bartels et al. 1994). Der Grund dafür war, dass die Antikörper ohne künstliche Membranporen nicht in das Zytosol eindringen konnten, um dort an ihren Zielstrukturen zu wirken. Dies bedeutet, dass Anti-LK-AK nicht wirken können, wenn das BoNT bereits in das Zytosol endozytiert wurde (Schmitt et al. 1981). Werden die Anti-LK-Antikörper allerdings in das Zytosol eingebracht, kann es zu einer Toxinneutralisierung kommen (Bartels et al. 1994).

In der Literatur finden sich zahlreiche Berichte über Kombinationen von Antikörpern, welche bei Patienten mit Therapieversagen aufgetreten sind. Es wurden auch monoklonale Antikörper gefunden, welche unabhängig voneinander sowohl gegen die Translokations- als auch gegen die katalytische Domäne gerichtet waren und die damit eine neutralisierende Wirkung entwickelten (Wu et al. 2001). Der genaue Neutralisierungsmechanismus dieser monoklonalen Antikörper ist noch unbekannt. Man vermutet allerdings eine erhöhte Clearance des BoNT nach Bindung multipler Antikörper (Smith et al. 2005).

Eine weitere interessante Entdeckung ist das sogenannte Switch-Phänomen (Atassi et al. 2005). Hierbei kommt es zu einem Wechsel der Immunglobulinklassen (vom nicht-protectiv wirkenden IgM zum protectiv-wirkenden IgG) von BoNT-Antikörpern. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass bei Antikörper-positiven Patienten, die noch eine Response zeigen, im weiteren Verlauf der Therapie ein sekundäres Therapieversagen (sTV) auftritt.

Zum jetzigen Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass die SK-Blockierung der am stärksten protective Wirkungsmechanismus von BoNT-Antikörpern ist (Amersdorfer et al. 1997, Atassi et Oshima 1999, Atassi and Dolimbek 2004, Atassi et al. 2005). Diese Antikörper sind vermutlich größtenteils für die Entwicklung eines sTV verantwortlich.

1.2.3 Therapieversagen

Therapieversagen, welches jede Situation bezeichnet, in welcher der Patient und/oder der Arzt nicht mit dem therapeutischen Ergebnis zufrieden ist (Dressler 2004), kann in verschiedene Kategorien unterteilt werden. So ist zunächst zwischen primärem Therapieversagen, bei dem bereits die erste Injektion keine Wirkung zeigt, und sekundärem Therapieversagen, bei dem sich erst nach mehreren Injektionen eine Wirkungsabschwächung bzw. ein Wirkungsverlust einstellt, zu unterscheiden. Wirkungsabschwächung, bei der nur Teilaspekte der Behandlung beeinträchtigt sind, wird auch als partielles Therapieversagen bezeichnet, Wirkungsverlust, bei dem auch Nebeneffekte ausbleiben, komplettes Therapieversagen.

Des Weiteren wird zwischen temporärem und definitivem Therapieversagen unterschieden. Bei ersterem beschränkt sich der Wirkungsverlust auf einzelne Therapieintervalle, während beim definitiven Therapieversagen auch wiederholte Injektionen keine Wirkung mehr zeigten.

Schließlich ist eine Einteilung in subjektives (nur der Patient berichtet über einen Wirkungsverlust) und objektives Therapieversagen (auch der Arzt bestätigt einen Wirkungsverlust) möglich (Dressler 2004).

Die wesentlichen Gründe für ein primäres Therapieversagen sind :

- Fehldiagnosen (z.B. kongenitale Ptose, Myasthenia gravis, offene Lidapraxie bei vermutetem Blepharospasmus oder CD).
- Klinische Subtypen mit verminderter BoNT-Sensitivität (z.B. Antecollis und Tremorformen bei CD oder sensorischer Blepharospasmus).
- Primäre Fehlinjektionen.
- Wirkungsabschwächung des BoNT-Präparates während des Transportes oder unsachgemäßer Lagerung.
- Andere potentielle Ursachen, wie z.B. prädispositionierende Antikörper bei vorhergehender Botulismus-Erkrankung oder kreuzreagierende Antikörper bei Tetanus, wurden bisher noch nicht bestätigt.

Auch für ein sekundäres Therapieversagen kommen mehrere Gründe in Betracht:

- Die fortschreitende Krankheit führt zur Zunahme des Schweregrades (Dressler 2004).
- Das Muster der Muskelüberaktivität ändert sich (Gelb et al. 1991).
- Der sogenannte Honeymoon-Effekt klingt ab (Hsiung et al. 2002).
- Ein Plazebo-Effekt (Miller et al. 2006).
- Fehlinjektionen im Behandlungsverlauf
- Stress-Symptomatik beim Patienten
- Auftreten von neutralisierenden Anti-BoNT-Antikörpern.

Die Bildung von Antikörpern ist also nicht immer der Grund für ein Therapieversagen. In einer kürzlich publizierten Studie von Lange et. al (2009) wurden nur bei ca. 50% der im MDT getesteten Therapieversager Antikörper nachgewiesen.

Ein Wechsel des BoNT-Präparats von BoNT/A zu BoNT/B kann bei sekundärem Therapieversagen zu einer erneuten Response führen. Laut Atassi (2004) kommt es allerdings bei 1/3 dieser Patienten nach 3-4 Injektionen zu einem erneuten Therapieversagen. Das beruht vermutlich hauptsächlich auf der Kreuzreaktivität der neutralisierenden Antikörper, denn die verschiedenen BoNT-Serotypen weisen zahlreiche homologe Sequenzen auf (Atassi 2004) (siehe 1.1.5).

1.3 Spastik

1.3.1 Definition und Klassifikation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen vorwiegend Patienten mit Spastik untersucht werden. Unter den zahlreichen Ursachen der Spastik steht der zerebrale Insult ganz im Vordergrund. Hinzu kommen Hirn-Traumata, Anoxie, neurochirurgische Eingriffe, Rückenmarksverletzungen, Multiple Sklerose und andere neurologische Ursachen (Ward 2008).

Nach der bis heute gültigen Definition von Lance (1980) zählt Spastik zum Erkrankungsbereich der Bewegungsstörungen.

Davon ausgehend beschrieb Young (1994) die Spastik als Teil der oberen Motoneuronen-Erkrankungen und definierte sie wie folgt: „Eine geschwindigkeitsabhängige Erhöhung des Muskeltonus mit übertriebenen Sehnen-Reflexen, resultierend aus einer Überregbarkeit des Streck-Reflexes in Verbindung mit anderen Merkmalen des oberen Motoneuronen-Syndroms“.

Weiterhin unterschied er zwischen spastischer Parese und spastischer Dystonie, welches zwar umstrittene Termini sind, die jedoch die positiven und negativen Merkmale berücksichtigen. Im europäischen Raum werden diese häufig als Plus- und Minus-Symptomatik bezeichnet.

In der folgenden Tabelle sind die unterschiedlichen Positiv- und Negativ-Symptome bei Spastikerkrankungen gegenübergestellt.

Tabelle 4: Positiv/Plus- und Negativ/Minus- Symptomatik bei Spastik (modifiziert nach Ward 2008)

Positiv / Plus	Negativ / Minus
Erhöhter Muskeltonus	Parese
Pathologische Sehnenreflexe	Verlust der Feinmotorik
Positiver Streckreflex	Verlust der Geschicklichkeit
Positiver Extensor-streck-Reflex	Ermüdung
Lösender Flexoren-Reflex	Frühe Hypotonie
Positiver Babinski-Reflex	

Eine klinische Einteilung der Symptomatik ist allerdings problematisch, da die obere Motoneuronen-Erkrankung in einer Vielzahl von Erscheinungsformen auftreten kann. Diese hängen vom Alter, der Lokalisation und der Größe der Läsion ab (Ward 2008).

Deshalb hat das „SPASM Consortium in Newcastle-upon-Tyne“ versucht, die bisherige Definition wie folgt abzuwandeln, um sie auf eine praxistauglichere Basis zu stellen und sie für Klinik und Forschung zu vereinfachen (SPASM 2005): „Angenommen, dass alle unfreiwilligen Aktivitäten Reflexe einschließen, handelt es sich bei der Spastik um eine intermittierende oder anhaltende unfreiwillige Hyperaktivität der Skelettmuskulatur mit einer Schädigung der Motoneuronen.“

Diese Definition berücksichtigt auch die Tatsache, dass aus einer Schädigung des Gehirns oder Rückenmarkes verschiedene Symptome resultieren können und dass das Auftreten einer Spastik nur deren Folgen sein kann (Ward 2008).

Nach ihrer Lokalisation wird die Spastik in drei verschiedene Formen eingeteilt, fokal (z.B. nur der Arm einer Seite ist betroffen), multifokal (Arm und Bein einer Seite sind betroffen) und generalisiert (über den ganzen Körper verteilte Spastik).

Bei fehlender Behandlung führt die Spastik zu einer immer stärker werdenden Überaktivität des Muskeltonus und endet in der irreversiblen Kontraktion eines oder mehrerer Gelenke und Weichteile, sogenannte Kontrakturen.

1.3.2 Behandlung von Spastik-Patienten mit Botulinumtoxin

Die Behandlung der Spastik beginnt in der Regel dann, wenn beim Patienten ein Leidensdruck einsetzt.

Generell soll sie die abnormen sensorischen Inputs reduzieren, um die unkontrollierte α - Motoneuronen-Aktivitäten zu vermindern (Gracies et al. 1997).

Unter allen Behandlungsmöglichkeiten ist die Physiotherapie von großer Bedeutung. Dazu gehören Stretching, Haltungsübungen, orthopädische Schienen und Schmerzreduktion (Barnes 1992).

Die medikamentöse Therapie kommt als adjuvante Therapieform hinzu. Hierbei spielt BoNT eine bedeutende Rolle, da es sehr spezifisch die Spastik reduzieren kann und eine physiotherapeutische Intervention erleichtert. Um einen Patienten allein mit physiotherapeutischen Maßnahmen in einen akzeptablen Zustand zu bringen, wäre es im allgemeinen nötig, mehrere Stunden täglich physiotherapeutische Maßnahmen anzuwenden. Das ist jedoch in der Praxis kaum realisierbar (Ward 2008).

Vor Behandlungsbeginn ist es wichtig, dass unter Beteiligung von Patient, Pfleger, Physiotherapeut und Arzt das Therapieziel festgelegt wird. Dem Patienten muss klargemacht werden, dass die Behandlung auf eine Reduktion der Spastik abzielt und nicht zu einer kompletten Genesung führt. Weiterhin ist dem Patienten zu erläutern, dass Kontrakturen irreversibel sind. Die Art der Behandlung ist in speziellen Therapieplänen festzuhalten, welche für jeden Patienten die individuell beste Therapieform beschreiben.

Grundsätzlich sollte ein Behandlungsplan folgende Struktur aufweisen:

1.) Anamnese / Patienten-Beurteilung

Vor Therapiebeginn ist der Patient hinsichtlich seiner Restfunktionen und Bewegungsspielräume zu untersuchen und die Ergebnisse sind zu dokumentieren. Eventuell ist eine Untersuchung im Gang-Labor einzuschließen. Vorrangiges Ziel ist es, die zugrundeliegende Pathophysiologie zu erkennen und die Spastik in fokal, multifokal oder generalisiert einzuteilen. Wenn die Behandlung mit BoNT geplant ist, sollte der behandelnde Arzt mit der Anatomie der einzubeziehenden Muskeln besonders gut vertraut sein.

2.) Indikation festlegen

Um über die Behandlung mit BoNT zu entscheiden, ist folgender Fragenkatalog zu beantworten, aus dem sich ergibt, ob eine Behandlung mit BoNT sinnvoll ist (modifiziert nach Turner-Stokes und Ward, 2002):

- 1: Was ist das Problem und könnte BoNT helfen?
- 2: Gibt es signifikante Muskelüberaktivitäten, welche effektiv durch BoNT behandelt werden können?
- 3: Betrifft das Problem eine Vielzahl von Muskeln?
- 4: Gibt es eine klare Behandlungsindikation?
- 5: Sind die Vorteile einer BoNT-Behandlung erwiesen?
- 6: Gibt es Kontraindikationen für eine Behandlung mit BoNT?
- 7: Wie werden die Therapieziele bewertet und gibt es alternative Maßnahmen?

Die wichtigsten Indikationen für eine antispastische Therapie sind in der folgenden Tabelle 5 zusammen gestellt.

Tabelle 5: Indikationen für eine antispastische Therapie (modifiziert nach Ward, 2008)

Indikation	Beispiel
Funktionelle Verbesserung	<ul style="list-style-type: none"> - Mobilität - Sexualfunktion
Symptomentlastung	<ul style="list-style-type: none"> - Weniger Schmerz - Weniger Muskelspastik - Möglichkeit, Orthesen zu tragen - Verbesserte Hygiene - Kontrakturen vorbeugen
Stellungsverbesserung	<ul style="list-style-type: none"> - Körperbild verbessern
Verminderte Hilfflosigkeit	<ul style="list-style-type: none"> - Hilfe beim Anziehen - Pflege und Hygiene - Nahrungsaufnahme
Verminderte Weiterbehandlungen	<ul style="list-style-type: none"> - Unnötige weitere Medikamente - Therapie erleichterungen - Chirurgische Maßnahmen vorbeugen

3.) Therapieziele festlegen

Sowohl der Arzt als auch der Patient sollten sich über die durch die Behandlung mit BoNT erreichbaren Ziele einigen. Bei vielen Patienten ist es nicht möglich, eine komplette Normalisierung der Spastik zu erreichen. Das muss den Patienten klar gemacht werden, damit von vornherein realistische Ziele festgelegt werden.

4.) Behandlungsmöglichkeiten eruieren

Es sollten an dieser Stelle auch andere Behandlungsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden. Tabelle 6 gibt einen Überblick über das Behandlungsspektrum der Spastik einschließlich der Vor- und Nachteile der jeweiligen Therapieformen

Behandlung	Arzneimittel und Eigenschaften	Probleme
Orale Medikamente	<ul style="list-style-type: none"> - Baclofen und Dantrolen – günstig - Tizanidine (7x so teuer wie Baclofen) - Gabapentin, Pregabalin 	<ul style="list-style-type: none"> - 40 % der Patienten können orale antispastische Mittel aufgrund von Nebenwirkungen oder ungenügender antispastischer Wirkung nicht einnehmen.
Botulinumtoxin	<ul style="list-style-type: none"> - Effektiv bei fokaler Spastik - Einfach zu verordnen - Einfache intramuskuläre Injektion - Benötigt einen erfahrenen Kliniker 	<ul style="list-style-type: none"> - Teuer, aber selten zu verabreichen - Budget-Limitierungen - Nebenwirkungen - Hoher Aufwand für das Management
Phenol-Injektionen und “Motor-point-block”	<ul style="list-style-type: none"> - Billig - Besonders erfolgreich bei multifokaler Spastik in Kombination mit BoNT 	<ul style="list-style-type: none"> - Lange Applikationszeit - Schmerzhaft - Ernste Nebenwirkungen möglich
Intrathekales Baclofen (ITB)	<ul style="list-style-type: none"> - Teure Geräte - 8-10 Jahre Lebensdauer - Pumpe muss angepasst werden - Relativ problemfreie effektive Behandlung 	<ul style="list-style-type: none"> - Benötigt die Freigabe des Krankenhauses und der Chirurgie zur Anpassung der Pumpe - Notwendigkeit einer verlängerten stationären Beobachtung - Patientenschulung und Compliance vorausgesetzt
Intrathecales Phenol	<ul style="list-style-type: none"> - Lumbal Punktion erforderlich, aber unkompliziert im Vergleich zu ITB - Billig 	<ul style="list-style-type: none"> - Nur für stark behinderte Patienten mit limitierter Lebenserwartung - Führt zur Inkontinenz, welche schon vorher verloren sein sollte
Chirurgie	<ul style="list-style-type: none"> - Neurochirurgische und Orthopädische Eingriffe - Teuer aber nützlich - Geringe Indikationen und Patienten 	<ul style="list-style-type: none"> - Schmerzhaft, irreversible und invasiv - Variable Ergebnisse und Effektivität - Parästhesien, Darm und Blasenveränderungen

Tabelle 6: Behandlungsmöglichkeiten der Spastik (modifiziert nach Ward, 2008)

Im Vergleich zu den vielen alternativen Behandlungsmöglichkeiten der Spastik nach Schlaganfall ergab eine umfangreiche Literaturrecherche von Simpson et al. (2008), dass die Behandlung mit BoNT das beste Outcome aufwies. Das galt insbesondere für den Vergleich mit der weit verbreiteten Behandlungsoption mit einer Baclofen-Pumpe (Simpson et al. 2008).

5.) Behandlung des Patienten nach evidenzbasierten Richtlinien

Für die Behandlung mit BoNT existieren Leitlinien, nach denen die jeweils optimale Therapie festgelegt werden sollte.

Kontrolle und Therapieerfolge aufzeichnen

Die Erfolgskontrolle bei der Spastikbehandlung ist nicht simpel, da keine eindeutigen und rasch in einer Therapiesitzung durchzuführenden Tests verfügbar sind. Zwar gibt es einige Möglichkeiten, um Fortschritte zu dokumentieren, sie sind allerdings eher auf Forschungsstudien zugeschnitten.

Um den klinischen Erfolg zu dokumentieren, verwenden viele Kliniker die Ashworth-Scale. Diese widerspiegelt zwar nicht die gesamte Komplexität des Behandlungserfolges, sondern beschreibt vor allem die Verbesserung der Extremitätenversteifung. Ihr Hauptvorteil ist die einfache Anwendung.

Andere Tests, wie die Tardieu-Scale (Tardieu et al. 1954) oder der Pendulum-Test (Wartenburg 1951) können zwar mehr Facetten der Spastik beurteilen, eignen sich aber im klinischen Alltag nicht.

Ein wichtiger Punkt bei der Behandlung von Spastik mit BoNT ist die richtige Injektion. Sie setzt zum einen ein gutes anatomisches Know-How voraus, zum anderen muss auch die richtige Injektionstiefe berücksichtigt werden. Bei einer Fehlinjektion kommt es zwar in der Regel nicht zu einer erhöhten Nebenwirkungsrate einschließlich Schmerzsymptomatik, aber die erwähnte Wirkung tritt nicht ein oder ist abgeschwächt. Um dies zu vermeiden gibt es diverse „Muscle-charts“, d.h. Muskel-Injektions-Pläne, die es erleichtern, den richtigen Muskel zu treffen (Turner-Stokes and Ward, 2002).

Bei kleineren Muskeln oder in der Tiefe liegenden Muskeln ist es ratsam, Lokalisationshilfsmittel zu verwenden. Dies trifft z.B. für die Behandlung einer spastischen Dysphonie zu, bei der direkt in den M. vocalis injiziert wird.

Um eine exakte Lokalisation der zu injizierenden Muskeln abzusichern, haben sich vor allem zwei Methoden bewährt:

(1) Die erste Möglichkeit beruht auf der elektromyographischen Untersuchung. Es ist die derzeit generell bevorzugte Methode zur Muskellokalisierung (Ward 2008). Dabei wird das Aktionspotential des Muskels nach fokussierter Kontraktion des Muskels gemessen. Die fokussierte Kontraktion ist vor allem bei Muskeln, wie dem M. digitorum superficialis und dem M. digitorum profundus, von Vorteil, da diese Muskeln in Faszikeln angeordnet sind, wobei jeder Faszikel einem einzelnen Finger zuzuordnen ist. So kann entweder genau der richtige Muskelanteil paralytisiert werden, welcher z.B. beim Schreibkrampf kontrahiert, oder es kann generell eine bessere Paralyse erreicht werden.

Ein weiterer, allerdings noch nicht beim Menschen bestätigter Vorteil besteht darin, dass der Arzt das BoNT sehr nah an die motorische Endplatte injizieren kann, wodurch die Diffusionszeit verkürzt wird und eine niedrigere Dosis nötig ist, um die gewünschte Paralyse zu erreichen (Finsterer et al. 1997).

(2) Die zweite Möglichkeit der BoNT Injektion zur exakten Lokalisierung der zu injizierenden Muskeln besteht in der Bildgebung mittels Computertomographie oder Sonographie. Das CT scheidet aufgrund des Aufwandes und der Strahlenbelastung aus. Die Ultraschalluntersuchung wäre hier die bessere Alternative. Allerdings benötigt man neben dem teuren Ultraschallgerät auch einige Erfahrung mit dieser Untersuchungstechnik. Bei vielen älteren Geräten ist zudem die Auflösung nicht hoch genug. Für den richtigen Umgang mit der Sonographie werden in jüngster Zeit vermehrt Seminare auch für Ärzte angeboten, die eine BoNT-Therapie anwenden.

Zur Veranschaulichung der Therapie von Spastik nach Schlaganfall zeigen die Darstellungen in Abbildung. 3 die Fehlhaltungen der oberen Extremität, welche zur Zeit für eine Therapie mit dem neuen komplexproteinfreien Xeomin® zugelassen sind. Häufig sind bei der Spastik jedoch andere Muskelgruppen neben der Armspastik betroffen. Hierbei ist aus pflegerischer und funktioneller Sicht die Beinspastik von größter Bedeutung. Allerdings ist Xeomin® nur für die oben beschriebenen Krankheitsbilder und Muskelgruppen zugelassen. Da Xeomin® erst seit wenigen Jahren auf dem Markt und für den Einsatz bei Spastik nach Schlaganfall erst seit 2010 zugelassen ist, fehlen bisher Studien zur Beurteilung der Effektivität und der Nebenwirkungsrate, insbesondere des Auftretens von nBoNT-AK. Letztere sind aufgrund der

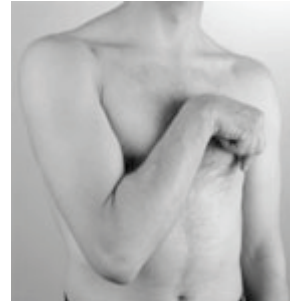
hohen Dosis bei Injektion in große Armmuskeln zu befürchten. Diese Problematik führt zur Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit.



Ellenbogenbeugung



Unterarmpronation



Handgelenkbeugung



Gefautete Hand



Spastischer Daumen

Abbildung 3: Fehlstellungen der oberen Extremität bei Spastik (www.Xeomin.de)

2 Zielsetzung

Konkret besteht das Ziel der vorliegenden Arbeit in der Beantwortung folgender Fragestellungen:

- (1) Welche klinische Wirkung hat das neue, komplexproteinfreie Botulinumtoxin A Xeomin[®] bei Patienten mit Spastik, dokumentiert anhand der modifizierten Ashworth-Scale (mAs), im Vergleich zu Patienten mit CD, dokumentiert anhand der TSUI-Scale im Beobachtungszeitraum von einem Jahr, wobei die Patienten entweder de novo mit Xeomin[®] behandelt oder von den konventionellen Präparaten Dysport[®] oder Botox[®] auf diese Behandlung umgestellt wurden?
- (2) Mit welcher Prävalenz treten bei den unter (1) genannten Patienten neutralisierende Anti-BoNT-A-AK auf und welcher der für die AK-Bildung relevanten Parameter, wie Einzeldosis, kumulative Dosis, Injektionsintervall, Alter bei Beginn der Therapie und Dauer der Behandlung, beeinflusst ihr Auftreten im untersuchten Patientengut?
- (3) Welche weiteren Nebenwirkungen der BoNT-A-Therapie sind unter der Behandlung mit Xeomin[®] zu verzeichnen?

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 40 Spastik-Patienten und zum Vergleich 47 Dystoniepatienten hinsichtlich der Effektivität der Xeomin®-Behandlung und des Auftretens von nBoNT-Antikörpern untersucht. Alle Patienten befanden sich während des Untersuchungszeitraums in Behandlung am Universitätsklinikum Rostock. Von allen eingeschlossenen Patienten waren 52 weiblich und 35 männlich. Von den 40 Spastik-Patienten waren 16 weiblich und 24 männlich. Ihr Alter lag zwischen 20 und 83 Jahren. 5 Spastik-Patienten fielen im Untersuchungszeitraum aus unterschiedlichen Gründen (s.u.) aus der Studie heraus. Die Verteilung der Patientendiagnosen ist in Abb. 4 veranschaulicht.

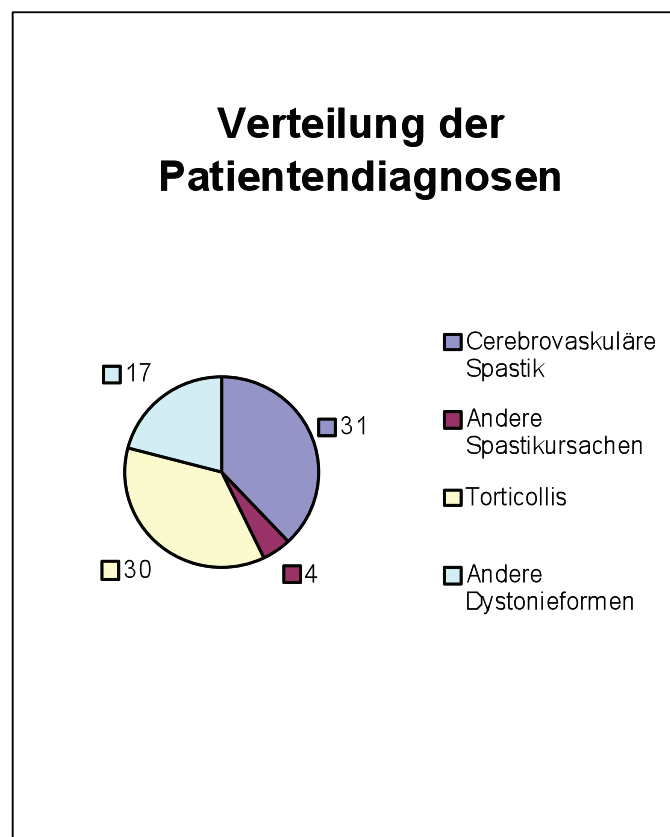


Abbildung 4: Verteilung der Patienten nach ihrer Krankheitsdiagnose

Alle Patienten wurden in chronologischer Reihenfolge untersucht. Sie wurden entweder mit Xeomin® de novo erstbehandelt wurden oder hatten zuvor schon eine Therapie mit Botox® oder Dysport® erhalten und waren jetzt auf Xeomin® umgestellt worden (Abb. 5). Der Behandlungszeitraum mit Xeomin® betrug für die Spastik-Patienten ≥ 1 Jahr und für die Dystonie-Patienten ≥ 3 Jahre. Bedingt durch die höhere Anzahl und Größe betroffener

Muskeln bei Spastik-Patienten entsprach ihre kumulative Xeomin®-Dosis während der ein- bis eineinhalbjährigen Behandlung etwa derjenigen der Dystonie-Patienten mit ihrer durchschnittlich drei- bis vierjährigen Behandlung.

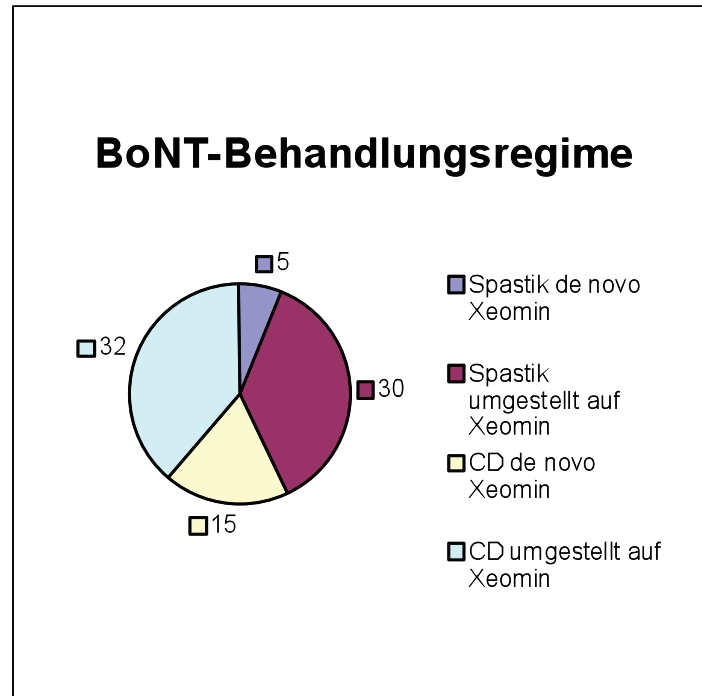


Abbildung 5: Verteilung der Patienten nach ihrem Behandlungsregime

Während der Botulinumtoxin-Sprechstunde an der Poliklinik für Neurologie der Universität Rostock wurde den Patienten 30 ml venöses Vollblut entnommen.

3.2 Klinische Untersuchung

Um eine Objektivierungsmöglichkeit für den Therapieerfolg zu finden, wurde vor der Behandlung und ein Jahr danach der Schweregrad nach dem modifizierte Ashworth-Score (mAs) erhoben.

Der mAs bietet eine Möglichkeit, die klinische Situation des Patienten in relativ kurzer Zeit zu ermitteln. Er beurteilt den Grad der Spastik anhand von fünf Schweregraden, welche die Steifigkeit der Gelenkbewegung durch die Spastik wiedergeben, an 5 Positionen:

Am Schultergelenk, Ellenbogen, Handgelenk, Fingergelenk und Daumen (siehe Tab. 7). Die Werte werden durch passives Durchbewegen der Extremitäten ermittelt.

Tabelle 7: Einteilung der modifizierten Ashworth-Scale

Grad	Beschreibung
0	Kein erhöhter Tonus
1	Leichte Tonuserhöhung, die an einem „catch and release“ erkennbar wird oder an einem minimalen Widerstand am Ende des Bewegungsausmaßes, wenn die betroffene Gliedmaße in Flexion oder Extension bewegt wird.
2	Leichte Tonuserhöhung, die an einem „catch“ erkennbar wird, dem ein minimaler Widerstand durch den restlichen (weniger als die Hälfte des) Bewegungsweg folgt.
3	Stärker ausgeprägte Tonuserhöhung durch die meisten Anteile des Bewegungsweges, die betroffenen Gliedmaße sind aber leicht beweglich.
4	Erhebliche Erhöhung des Muskeltonus, passive Bewegung ist schwierig.

Auch die klinische Response der Dystoniepatienten wurde neben der Patientenbefragung und ihrem subjektiven Eindruck von der BoNT-Wirkung nach einem objektiven Schweregrad-Scale erfasst. Dazu kam der Dystonie-Scale nach Tsui zur Anwendung. Mit ihm wird der Schweregrad der Haltungsabweichung in verschiedenen Haltungen in einer Skala von 0-18 eingeteilt und damit beurteilt.

3.3. Ethik

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Bundeslandes Mecklenburg-Vorpommern genehmigt. Die Patienten wurden in einem Gespräch über die Untersuchungen aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Aufnahme in die Studie.

3.4 Bestimmung von AK gegen BoNT-A mittels Maus Diaphragma-Test (MDT)

3.4.1 Reagenzien

◇ Sevofluran	SEVOrane®(Abott, #4456)
◇ Carbogen-Gas	5%CO ₂ /95%O ₂ (Messer Griesheim GmbH, Griesheim)
◇ Earle`s Balanced Salt Solution (EBSS)	gepufferte Salzlösung nach Earle (GIBCO™, Paisley, Scotland)
◇ Botulinumtoxin	Botulinumneurotoxin A7 (Lieferung der Charge #7, List Biological Lab. , Campbell, CA, USA über Europavertrieb durch Quandratech Diagnostics, Surrey, UK); Ampulle à 10 µg BT-A mit 100µl destilliertem H ₂ O rekonstituiert, unter Zugabe von 0,1 % Rinderserumalbumin-Albumin (Roth, #80762)
◇ Botulinumtoxin-Antikörper	Botulinumtoxin Typ A Antitoxin F (ab`) ₂ (NIBSC, #59/021). 5 ml Pferdeserum enthalten 500 IU Antitoxin (National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar)

3.4.2 Verbrauchsmaterialien

- ◇ Becherglas mit Deckel
- ◇ Dialyseschlauch 12,0 S MWCO: 12.000-14.000, #E683.1(ZelluTrans, Roth®, Karlsruhe)
- ◇ Dialyseverschlüsse (Roth®, Karlsruhe)
- ◇ Einwegkanülen 0,4x19mm (Microlance®, BD, Drogheda, Irland)
- ◇ Einwegkanülen 0,80x40mm (Sterican®, Braun, Melsungen)

- ◇ Einwegpipetten (Cellstar®, Greiner Bio-One)
- ◇ Einwegspritzen, 10ml (Braun, Melsungen)
- ◇ Einwegspritzen, 5ml (Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien)
- ◇ Eppendorf-Reaktionsröhrchen 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg) für Anti-BT-Pferdeserum
- ◇ Magnetrührstäbchen (Neolab, Heidelberg)
- ◇ Nähgarn
- ◇ Pinzette, anatomisch, 14 cm (Diameda Instrumente, Tuttlingen)
- ◇ Pipette (pipetus®akku, Hirschmann Laborgeräte)
- ◇ Präparierschere, 11cm (Westcott, Dimeda Instrumente, Tuttlingen)
- ◇ Präparierschere, 12cm (Noyes, Dimeda Instrumente, Tuttlingen)
- ◇ Reaktionsröhrchen, 0,2ml (Flat Cap, PCR Tubes, Molecular Bio Products, San Diego, CA, USA) für BT-Stammlösungen
- ◇ Serummonovetten®, 9ml (S-Monovetten, Sarstedt, Nürnberg)
- ◇ Styropor®platte
- ◇ Wägebapier (Macherey-Nagel, Düren)
- ◇ Zellkulturschalen, 40x10mm (TPP, Renner, Dannstadt)
- ◇ Zellkulturschalen, 60x15mm (TPP, Renner, Dannstadt)
- ◇ Zentrifugenröhrchen, 15ml (Greiner, Bio-One, Frickenhausen)
- ◇ Zentrifugenröhrchen, 50ml (Greiner, Bio-One, Frickenhausen)

3.4.3 Geräte

- ◇ Isolierte Organ Apparatur, Gerätesystem URO 24401 (FMI, Föhr Medical Instruments, Seeheim) mit PC-Anschluß und Software VitroDat (Ingenieurbüro G. Jäckel, Hanau)
- ◇ Magnet-Thermorührer 10515 (Fisherbrand, Fisher Scientific, Schwerte)
- ◇ Mini-Rührer (Mini MR standard, IKA®-Werke, Staufen)
- ◇ pH-Meter MP 220 (Mettler Toledo, Giessen)
- ◇ Waage (KPZ-Waage, Rüslikon, Schweiz)

- ◇ Wärmebad (auf 37°C einstellbar)
- ◇ Druckminderer für Carbogengas (FM 62 T, Messer Griesheim GmbH, Griesheim)
- ◇ Zentrifuge für Serumgewinnung

3.4.4 Versuchstiere

3.4.4.1 Tierhaltung

Es wurden als Versuchstiere weibliche HsdWin:NRMI Mäuse (Artikel-Nummer 27503F) der Firma Harlan-Winkelmann Borcheln verwendet. Das Gewicht lag zwischen 16-20 g, das Alter zwischen 6-8 Wochen. Die Tiere wurden in einem speziellen Versuchstierlabor entsprechend der Tierschutzbestimmungen gehalten. Dabei wurde ein Hell-Dunkelrhythmus von 12:12 eingehalten. Die Futter- und Wasseraufnahme erfolgte ad libitum.

3.4.4.2 Narkotisierung

Um die Versuchstiere zu präparieren, wurden sie mittels Sevofluran® in eine kurzzeitige Inhalationsnarkose versetzt. Hierzu wurde ein mit Sevofluran® getränktes Zellstofftuch in ein dünnes verschließbares Glasgefäß gelegt. Nach einer kurzen Wartezeit zur optimalen Verteilung des Gases im Glasgefäß wurde das Versuchstier in das Gefäß gegeben und eine ausreichende Narkosetiefe abgewartet (3-5 Sekunden je nach Größe des Tieres). Die Narkosetiefe sollte nicht zu tief sein, um einen möglichen Einfluss auf das spätere Hemidiaphragmapräparat zu verhindern.

3.4.4.3 Zwerchfellpräparation

Bei dem narkotisierten Versuchstier wurden nun beide Carotiden durchtrennt, damit das Versuchstier schnellst möglich ausblutet. Bei der Präparation sind blutleere Verhältnisse von essentieller Bedeutung. Im Anschluss wurde das Versuchstier mittels Kanülen auf einer Styroporplatte an den Extremitäten fixiert. Mittels einer Schere wurde im Anschluss das Fell des Tieres entfernt, um den Thorax zu eröffnen. Nach Entfernung des Rippenbogens beidseits bis zur untersten Rippe wurden die Lungenflügel freigelegt. Diese wurden an ihren jeweiligen Hili pulmonales unbeschädigt entfernt. Nach Entfernung der Lungenflügel wurde der rechte und der linke N. phrenicus dargestellt. Der rechte N. phrenicus verläuft bei der Maus verschmolzen mit der V. cava inferior in das Zwerchfell, der linke N. phrenicus verläuft über

das Herz und inseriert ebenfalls am Zwerchfell. Nach Darstellung der beiden Nerven wurden diese mittels Nähgarnfaden möglichst weit proximal fixiert, um sie danach proximal der Fixierungsstelle zu durchtrennen. Nach der Durchtrennung wurden beide Nerven zur Austrocknungsprophylaxe durch die zuvor intakt entfernten Lungenflügel bedeckt und somit feucht gehalten. Der nächste Schritt war die Präparation des Hemidiaphragmas. Nach Eröffnung des Peritoneums und Darstellung des Zwerchfells von distal (Entfernung von Magen, Leber, Milz inklusive der am Zwerchfell inserierenden Ligamente), wurde das Zwerchfell mittels eines sagittalen Schnittes in Richtung Wirbelsäule durchtrennt. Der Schnitt wurde so gewählt, dass beide Zwerchfelhälfen genug Centrum tendineum hatten, um sie später sicher in das Organbad zu hängen. Es entstanden also zwei keilförmige Präparate mit einer Spitze aus Centrum Tendineum und einer Basis aus Rippenbogen. Mittig in beide Präparate inserieren auf jeder Seite der jeweilige N. phrenicus. Beide Präparate eignen sich zur Messung mit Patientenseren, wobei das rechte Hemidiaphragma aufgrund der Verwachsung mit der V. Cava inferior etwas geringer auf die Stimulation reagiert als das linke Hemidiaphragma. Die fertigen Hemidiaphragmen wurden zur Austrocknungsprophylaxe in eine mit etwas EBSS befüllte Petrischale gelegt, um sie dann im Organbad zu befestigen.

3.4.5 Vorbereitung der Messapparatur

Vor Beginn der Zwerchfellpräparation wurde das Messsystem vorbereitet. Nach einer Spülung der Organbäder mit destilliertem Wasser wurden die Organbäder mit 5 ml EBSS gefüllt. Durch einen Durchlauferhitzer mit Thermostat wurde gewährleistet, dass die Temperatur im Bad konstant bei 37 °C lag. Um auch die Oxygenierung und pH-Stabilität bei 7,4 zu gewährleisten, wurde Carbogengas (95% O₂ / 5% CO₂) mit einem Druck von 0,1 bar über ein Schlauchsystem mittels einer Belüftungsfritte von unten in die Bäder eingelassen. Die Regulation des Carbogengasstroms erfolgte über ein Feinnadelventil. Eine ständige Kontrolle des Gasstroms war erforderlich, um eine übermäßige Schaumentwicklung während der Messung zu verhindern. Während der Äquibierungszeit von ca. 10 Minuten, in der sich eine optimale Oxygenierung, pH-Wert und Temperaturstabilität der Bad-Lösung bei 37°C einstellte, wurde die Diaphragmapräparation wie oben beschrieben durchgeführt.

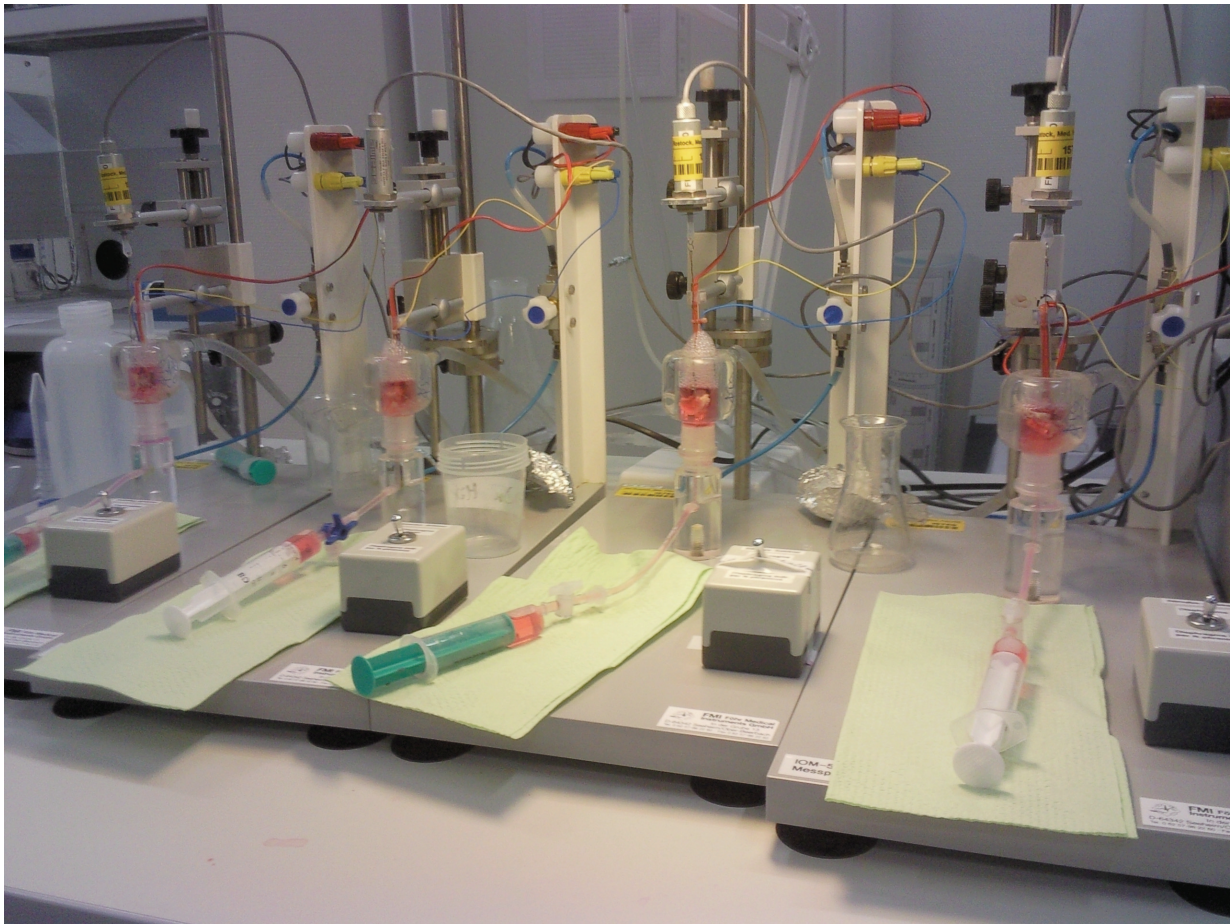


Abbildung 6: MDT-Messplatz mit 4 Organbädern und eingespannten Hemidiaphragma-Präparaten

3.4.6 Herstellung der BoNT-Verdünnung

Der erste Schritt war die Rekonstruktion der mit 10 µg BoNT-A gefüllten Ampulle der Firma List mit 100 µl Aqua-dist und mit 0,1% Rinderserumalbumin. Anschließend wurde die Lösung in 50 Tubes à 200 µl-PCR-Reaktionsröhrchen, à 2 µl aufgeteilt und bei -20 °C gelagert. Damit war die Stammlösung hergestellt.

Die Testreihen dieser Arbeit wurden mit der Lieferung BoNT-A7 durchgeführt.

Zur weiteren Verdünnung erfolgte zunächst die Zugabe von 200 µl EBSS mit 0,1% Rinderserumalbumin zu der 2 µl BoNT-Stammlösung und eine gründliche Durchmischung der Lösungen.

Das Rinderserumalbumin wird zur Stabilisierung des BoNT zugesetzt, da es die BoNT-Potenz um den Faktor 2-3 erhöht und die biologische Aktivität durch Vermeidung von Adsorption des BoNT an Plastik- oder Glasoberflächen erhält (Rosales et al. 2006).

Die hergestellte Arbeitslösung hatte nun eine Konzentration von 1 µg/ml A7 und wurde als Ausgangslösung für die weiteren Verdünnungen verwendet, sowohl für die BoNT-Dosis-Wirkungs-Kurve als auch für die Antikörper-Kalibrierungskurve. Bei Patientenseren konnte auf das 0,1% Rinderserumalbumin verzichtet werden, da im menschlichem Serum genug Albumin vorhanden ist.

Während die restlichen Stammlösungen bei -20°C jahrelang verwendbar sind, sollte die Arbeitslösung im Kühlschrank nicht länger als 7 Tage verwendet werden, da die Wirkung mit der Zeit nachlässt.

3.4.7 Messung der halbmaximalen Paralysezeit

Das zuvor sorgfältig präparierte Hemidiaphragma-Präparat wurde nun an seinem Centrum tendineum mittels einer feinen Metallklammer, an der ein feiner Draht mit Öse verläuft, an einen Kraftsensor (Transducer) aufgehängt. Ein Aufhängehaken fixierte das Präparat von unten, indem es in einer Tasche zwischen Rippe und Muskel des Präparates platziert wurde. Dadurch wurde nun gewährleistet, dass das Präparat isometrisch kontrahieren konnte und der Kraftsensor die volle Kraft sicher messen konnte. Der Nerv wurde mittels Nähgarnfaden in eine kleine Ringelektrode gezogen. Das zwischen Sensor und Haken fixierte, und an der Elektrode innervierte Präparat wurde nun in das EBSS-Bad eingelassen. Der Sensor konnte

die Kraft in mN messen und wurde durch Drehen eines Rädchens, welches das Präparat streckte, auf 5 mN Vorspannung eingestellt. Diese Vorspannung erlaubte es dem Präparat, eine maximale Kontraktion zu entwickeln, ohne durch eine Überdehnung beschädigt zu werden. Eine kontinuierliche, indirekte Stimulation, über den in der Ringelektrode liegenden Nerv erfolgte mit einer supra-maximalen Reizamplitude von 5 mV, einer Reizfrequenz von 1 Hz und einer Reizdauer von 0,1 ms (Wohlfahrth et. al 1997). Mittels des FMI VitroDat Aufzeichnungsprogramms konnten kontinuierlich die maximale Kontraktion und die Vorspannungswerte ermittelt und am PC dargestellt werden. Die Differenz zwischen den beiden Werten zeigte die Kontraktionskraft in mN an.

Um eine verwertbare Messung zu erreichen, musste sichergestellt werden, dass die Paralyse des Präparates durch das BT eingetreten ist und nicht durch das Präparat an sich. Deshalb wurde das Organbad erst gewechselt (mit Patientenserum oder BT-Verdünnungen), wenn die Kontraktion des Präparates 10 Minuten konstant mit einer Kontraktionskraft von mindestens 5 mN anhielt.

Nach Zugabe der BT-Lösungen unterschiedlicher Konzentration in das Organbad, mindestens 5 ml mit 0,1 % Rinderserumalbumin pro Bad, wurde beobachtet, wie sich die Kontraktion des Muskelpräparates verändert. Dabei war zu beobachten, dass die Kontraktion in den ersten 20-30 Minuten konstant bleibt und erst danach, je nach BoNT-Konzentration, schneller oder langsamer abflacht. Die maximale Kontraktion näherte sich dabei der Vorspannung an und die Differenz, also die Muskelkraft, nahm ab bis zur vollständigen Paralyse des Muskels. Zur Testauswertung wurden allerdings die halbmaximalen Paralysezeiten ($t_{1/2}$) verwendet.

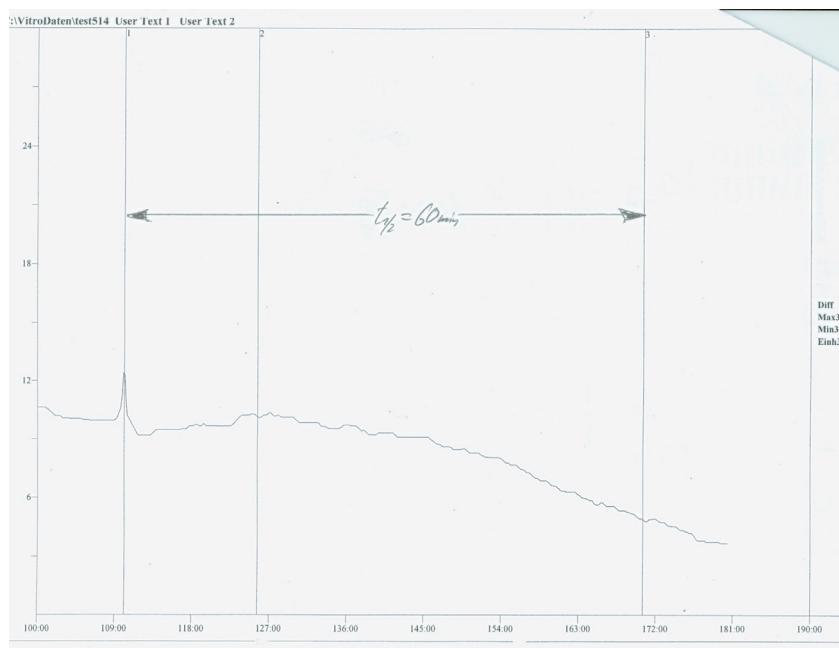


Abbildung 7: Kontraktionsverlauf bei einer BoNT-Konzentration von 0,5 ng/ml A7

3.4.8 Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve

Da für diese Studie eine neue Charge BoNT verwendet wurde (A7), musste auch hier erneut eine Dosis-Wirkungskurve erstellt werden, um zu ermitteln, bei welcher Konzentration die $t_{1/2}$ bei etwa 60 Minuten liegt (Göschel et al. 1997). Für diese Charge haben wir die $t_{1/2}$ bei Konzentrationen von 2,0 / 1,0 / 0,5 / 0,25 / 0,125 ng/ml ermittelt. Aus diesen $t_{1/2}$ wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, mit deren Hilfe es möglich war, die optimale BoNT-Konzentration für die nBoNT-AK-Messung zu ermitteln.

3.4.9 Herstellung der Antikörper-Verdünnungen

Zur Bestimmung der Menge an Antikörpern in einem Patientenserum war es nötig, eine Antikörper-Kalibrierungskurve zu erstellen, um sie später mit den $t_{1/2}$ der Patientenseren vergleichen zu können. Eine entsprechende Verdünnung wurde dadurch erreicht, dass zunächst 5ml Pferdeserum mit einer Konzentration von 100 U/ml nBoNT-Antikörper auf 10 Eppendorf-Röhrchen à 0,5 ml aufgeteilt wurden. Die damit erstellte Stammlösung konnte bei -20°C gelagert werden. Um die Verdünnungen herzustellen, wurde nun im ersten Schritt eine Verdünnung von 1:100 erstellt. Daraus ergab sich eine AK-Konzentration von 1 U/ml. Dazu wurden 100 $\mu\text{l/ml}$ der Stammlösung mit 10 ml EBSS und 0,1 % Rinderserumalbumin vermischt. Die so entstandene Arbeitslösung (1 U/ml) konnte über 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. In einem nächsten Schritt wurden nun die zu messenden AK-Konzentrationen hergestellt. Die Verdünnungsmedien waren auch hier EBSS und 0,1 % Rinderserumalbumin.

3.4.10 Inkubation des Standardantikörperserums mit BoNT

Nachdem die zu messende Konzentration an AK erstellt war, wurde diese mit BoNT so versetzt, dass eine Konzentration von 0,5 ng/ml BoNT resultierte. Diese Konzentration wurde durch die Dosis-Wirkungskurve ermittelt und wird auch bei den Patientenseren verwendet. Um eine vollständige Bindung der Antikörper an die BoNT-Moleküle zu gewährleisten, wurde die Antikörper-BoNT-Lösung im Wärmebad bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach konnten die Ansätze zum Badwechsel des Hemidiaphragmapräparats verwendet werden.

3.4.11 Dialyse der Patientenseren

In der Botulinumtoxin-Sprechstunde wurden den an der Studie teilnehmenden Patienten 30 ml venöses Vollblut entnommen. Dieses wurde nach einer einstündigen Inkubationszeit, in der eine vollständige Koagulation erreicht wird, 10 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Das so gewonnene Serum konnte dann bei -20°C gelagert werden. Als Zielvolumen haben wir uns auf mindestens 10 ml Patientens Serum geeinigt, um eine eventuelle Zweitmessung vornehmen zu können.

Der nächste Schritt in der Vorbereitung des MDT lag in der Dialyse des Patientens erums. Die Dialyse ist bestens geeignet, eventuell im Serum vorhandene Hemmfaktoren zu entfernen, welche gegebenenfalls die $t_{1/2}$ hätten verändern können. Die Dialyse erfolgte in Dialyses chläuchen gegen EBSS im Verhältniss 1:10. Zunächst eine Stunde lang bei Raumtemperatur, auf einem Schüttler. Danach wurde in einem zweiten Schritt das EBSS abgeschüttet und erneut frisch aufgefüllt, um es dann bei 4°C für 12 Stunden mit Schüttler zu dialysieren. Nach den 12 Stunden konnte das Serum entweder wieder bei -20°C eingefroren werden oder direkt für eine Messung mit BoNT versetzt und gemessen werden.

3.4.12 Bestimmung des AK-Titers in Patientenseren

3.4.12.1 Inkubation der Patientenseren mit BoNT

Um eine BoNT-Konzentration von 0,5 ng/ml in dem Patientens erum zu erreichen, wurden 5ml Patientens erum mit 2,5 μl BoNT-A7 Arbeitslösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Genau wie bei der Antikörperkalibrierungskurve musste nun das Serum für 1 Stunde im Wärmebad bei 37°C inkubieren, damit eine vollständige Antigen-Antikörperbindung stattfinden konnte.

3.4.12.2 Messparameter

Während der Stunde, in der die Inkubation der Patientenseren mit BoNT stattfand, wurde das Hemidiaphragma präpariert und in das Organbad eingehängt. Nach Ablauf der Stunde und Sicherstellung, dass das Präparat eine konstante Kontraktion aufweist, wurde der Badtausch durchgeführt.

Der Badwechsel mit Patientens erum markierte den Start der Messung der $t_{1/2}$. Abgesehen von der $t_{1/2}$ gab es noch einen anderen Indikator, ob Antikörper vorhanden waren oder nicht. Der Kurvenverlauf änderte sich nämlich durch das Vorhandensein von Antikörpern gegenüber

Seren, in denen keine Antikörper vorhanden waren. Bei Messungen ohne Antikörper bleibt die Kontraktion für 20-30 Minuten konstant, um dann relativ steil abzufallen. Es entsteht eine Art Knick. Wenn Antikörper im Serum vorhanden sind, dann ist dieser Knick weniger ausgeprägt, weil die Kontraktion langsam über längere Zeit abfällt. Dies ist selbst bei geringsten Mengen von Antikörpern zu beobachten (ab 0,1 mU/ml).

Da sich die $t_{1/2}$ mit zunehmender Konzentration an Antikörpern im Serum verlängert, ist es möglich, anhand der vorher erstellten Antikörperkalibrierungskurve die Konzentration an Antikörpern zu ermitteln.

4 Ergebnisse

4.1 BoNT-Dosisfindung und Antikörperkalibrierungskurven für den MDT

Alle Anti-BoNT-AK-Konzentrationsbestimmungen wurden mittels des MDT durchgeführt, nachdem die hierzu erforderliche Technik zuvor evaluiert und ihre Durchführung optimiert wurde.

Voraussetzung für die AK-Titerbestimmung in Patientenseren ist die Ermittlung der optimalen BoNT-Dosis für eine $t_{1/2}$ von 50-60 Minuten sowie die Erstellung einer AK-Kalibrierungskurve unter Verwendung eines Pferdestandardserums. Alle Untersuchungen wurden mit einer einzigen Charge (A7) des gereinigten BoNT-A-Präparates der Firma List durchgeführt. In laborinternen Tests wurde die Haltbarkeit des Präparates geprüft. Es ergab sich in Übereinstimmung mit Literaturangaben (Sloop et al. 1997), dass die volle Wirkung einer 1:50-Verdünnung der BoNT-Stammlösung für eine Woche bei 4° C erhalten bleibt. Anti-BoNT-A-AK-Pferdeserum war bei 4°C über mindestens 4 Wochen verwendbar. Die zur Zwerchfellpräparation verwendeten Versuchstiere wurden so ausgewählt, dass ein Maximalgewicht von 25g nicht überschritten wurde, da die Diaphragmasensitivität für BoNT bei schwereren Tieren herabgesetzt ist (persönliche Mitteilung von Prof. H. Bigalke).

4.1.1 Botulinumtoxin-A7-Dosis-Wirkungskurven

Für die Ermittlung der optimalen BoNT-Konzentration der Charge BoNT-A7 für die AK-Messung wurden in Testserien mit den in Tabelle 8 aufgeführten BoNT-Konzentrationen die $t_{1/2}$ des Maushemidiaphragmas bestimmt.

Tabelle 8: Testserien zur Bestimmung der optimalen halbmaximalen Hemidiaphragma-Paralysezeit

BoNT-Konzentration [ng/ml]	0,125	0,25	0,5	1	2
Anzahl [n]	6	7	18	6	6
Mittelwert [min]	94,7	77,4	57,9	45,8	42,4
Median [min]	91,5	81	58	45,5	42,5
SD [min]	13,6	6,8	4,7	4,7	3,1

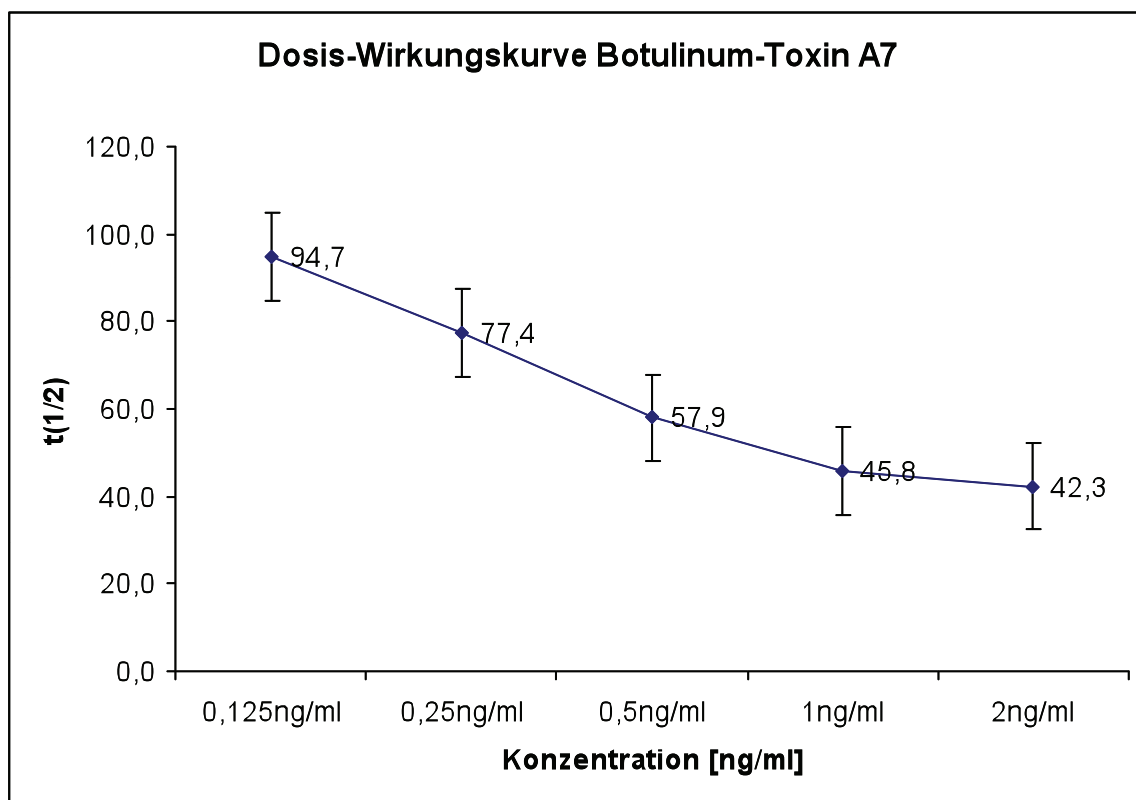


Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurve zur Ermittlung der Dosis für die Antikörperbestimmung mit der BoNT/A7-Charge

Anhand der in der Tabelle aufgeführten Messwerte wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt (Abb. 8). Aus ihr ergab sich für die BoNT Charge A7 als optimale Dosis die Konzentration von 0,5 ng/ml. Bei ihr betrugen die mittlere $t_{1/2}$ und die SD 57 ± 5 min.

4.1.2 Antikörper-Kalibrierungskurve für Botulinumtoxin A7

Um eine Kalibrierungskurve für die Antikörper-Bestimmung in Patientenseren zu erstellen, wurden die $t_{1/2}$ von aufsteigenden Pferdeserum-Antikörper-Konzentrationen nach Vorinkubation mit 0,5 ng/ml BoNT-A7 gemessen. Hierzu wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1 mU/ml. Aus insgesamt 46 Messungen (Tabelle 9) ergab sich die in Abb. 9 dargestellte Antikörpertiterkurve. Aus ihr wurden in der Folge graphisch die Antikörper-Konzentrationen in Patientenseren ermittelt.

Tabelle 9: Messserien zur Bestimmung der Antikörper-Kalibrierungskurve

Anti-BoNT-A7-Konzentration [mU/ml]	Anzahl [n]	$t_{1/2}$ Mittelwert [min]	$t_{1/2}$ SD [min]
0,1	5	62,2	6,8
0,5	7	63,7	7,8
1	10	76,9	9,1
2,5	10	91,1	14,9
5	8	111,9	13,0
10	6	162,5	11,8

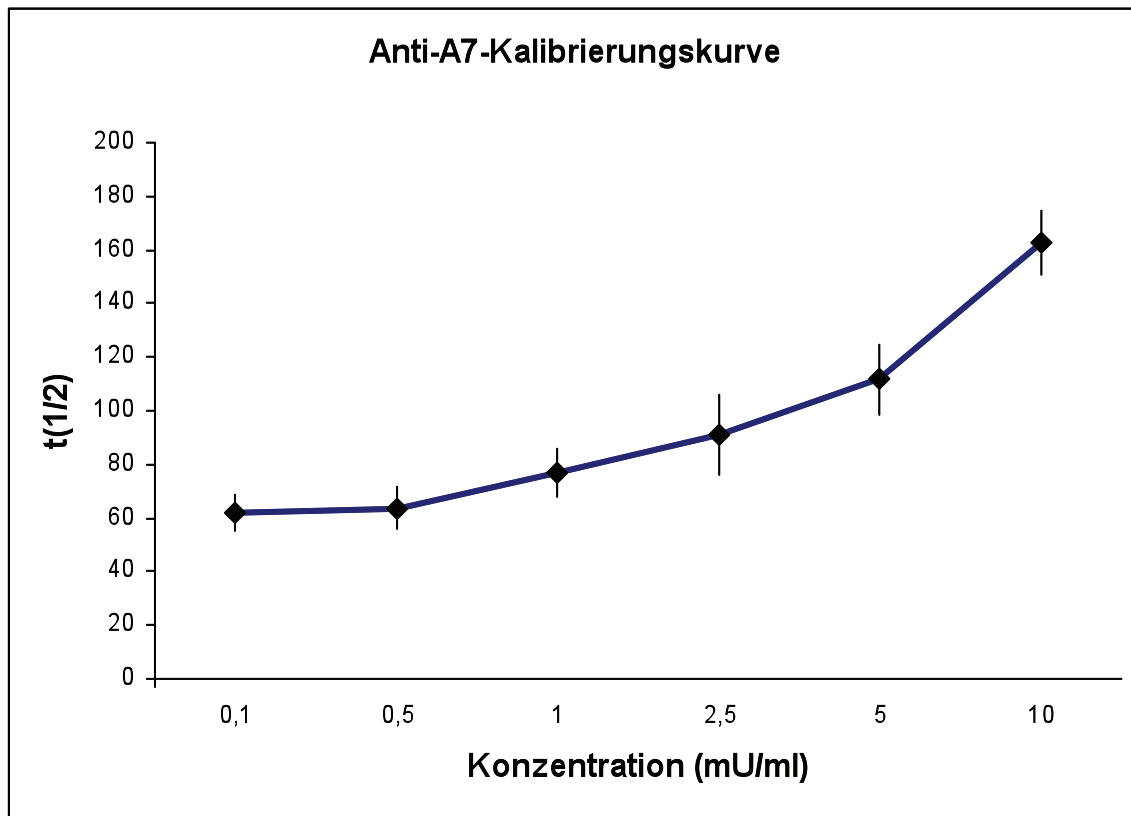


Abbildung 9: Antikörper-Kalibrierungskurve für BoNT-A7

4.2 Ergebnisse der Patientenuntersuchung

4.2.1 Antikörperbestimmung mit dem MDT

4.2.1.1 Ergebnisse des Nachweises von AK bei Spastikpatienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 40 Spastik-Patienten mit dem Maus-Diaphragma-Test untersucht, von denen vor Abschluss der Studie fünf aus unterschiedlichen Gründen (TV, Wohnortwechsel etc.) ausschieden. Bei den verbleibenden 35 Patienten handelt es sich um 21 männliche Patienten und 14 weibliche Patientinnen. Die Spastik beruhte bei 31 Patienten auf einem cerebrovaskulären Insult, bei drei Patienten auf einem frühkindlichen Hirnschaden der Patienten und bei einem Patienten auf einer Borrelienerkrankung. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug $58 \pm 15,2$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Jahre. Fünf Patienten wurden de novo mit Xeomin® behandelt, neun wurden vorher mit Botox® therapiert, 18 mit Dysport® und fünf mit beiden Präparaten. Vor Therapieumstellung auf Xeomin® betrug die durchschnittliche Injektionszahl

- für Botox[®] allein $17,8 \pm 11,8$,
- für Dysport[®] allein $16,9 \pm 16,6$ und
- für die Kombination beide Präparate $16,8 \pm 13,0$.

De novo Xeomin-behandelte Patienten erhielten $5,0 \pm 5,0$ Injektionen.

Die Gesamtbehandlungsdauer betrug zwischen 12 Monaten und 12 Jahren. Die Daten für die mittlere Einzeldosis und die mittlere Kumulativdosis betrugen

- für Botox[®] $452,8 \pm 90$ U mit einer mittleren Kumulativdosis von $8110,6 \pm 6296,9$ U
- für Dysport[®] $1005 \pm 117,9$ U (Äquivalenzdosis (ÄqD) $335 \pm 39,3$ U) mit einer mittleren Kumulativdosis von $16610 \pm 16540,4$ U (ÄqD $5536,6 \pm 5513,5$ U) und
- für beide Präparate $531,2 \pm 62,3$ U mit einer mittleren Kumulativdosis von $9228,4 \pm 8291$ U.

De novo Xeomin[®]-Patienten erhielten Einzeldosen von 300 ± 342 U und Kumulativdosen von 1500 ± 1651 U.

Alle Patienten sprachen primär gut auf die Behandlung mit BoNT an. Bei 38 Patienten traten bis zum Zeitpunkt der Messung keine subjektiven Wirkungsabschwächungen auf. 2 Patienten schieden nach der ersten Blutentnahme aus der Studie aus. Einer dieser Patienten hatte in der ersten Messung einen erhöhten AK-Titer und schied wegen sekundären Therapieversagens aus der Studie aus. Aus der ersten Messung gingen 5 Patienten hervor, die schon bei der ersten Blutentnahme und Messung einen erhöhten Antikörpertiter aufwiesen. Die Höhe des Titers befand sich bei drei dieser Patienten unter 1.0 mU/ml. Ein Patient wies einen Titer von 0,9 mU/ml auf, der durch sTV ausgeschiedene Patient wies einen Titer von 1.0 mU/ml auf. Bei den positiv getesteten Patienten fiel ein erhöhtes Durchschnittsalter von $65,4 \pm 9,6$ Jahren auf. Des weiteren wurden alle positiv getesteten Patienten mit $58,6 \pm 38,6$ Monaten länger als der Durchschnitt behandelt ($49 \pm 48,4$ Monate). 4 Patienten wiesen eine überdurchschnittliche Gesamtzahl an Injektionen auf (> 20).

Die AK-Frequenz für alle Spastikpatienten in Verbindung mit einem kompletten Therapieversagen liegt damit bei 2,8 % (1 von 35). Wenn man alle Patienten mit einem erhöhten AK-Titer in die Rechnung einbezieht, auch wenn sie kein Therapieversagen haben (Borderline), dann liegt die AK-Frequenz bei 14,2 % (5 von 35).

Tabelle 10: Patientencharakteristika der AK-positiven Spastikpatienten

Pat. Nr.	390	392	395	420	389
Geschlecht	m	m	m	w	w
Alter	65	69	71	49	73
Diagnose	HS li 2003	HS li 1999	HS re 2003	HS li 2004	
Präparat vor Xeomin®	Dysport®	Dysport®	Botox®	Botox®	Dysport®
Anzahl Injektionen vor Xeomin®	22	16	9	28	23
Anzahl an Injektionen mit Xeomin®	5	5	5	5	1
Anzahl an Injektionen gesamt	27	21	14	33	34
Therapiedauer vor Xeomin® [Monate]	88	48	34	72	50
Therapiedauer mit Xeomin® (Gesamt) [Monate]	100	60	47	85	54
Mittleres Injektionsintervall [Monate]	3,7	2,9	3,4	2,6	2,3
Mittlere Einzeldosis vor Xeomin® [MÄq]	333,3	333,3	360	450	333,3
Mittlere Einzeldosis mit Xeomin® [MÄq]	300	300	380	200	400
Kumulative Dosis vor Xeomin® [MÄq]	7333	5333	3240	12600	11000
Kumulative Dosis mit Xeomin®	1500	1500	1900	1000	400
Gesamte Kumulative Dosis	8.833	6.833	5140	13600	11.400
t _{1/2} [min] vor Therapieumstellung	78	81	72	72	83
AK-Titer [mU/ml] vor Therapieumstellung	1,3	1,5	0,8	0,8	1,7
mAs vor Therapieumstellung	1_2_1_2_1	2_3_2_3_1	2_2_2_2_2	0_0_2_2_2	3_2_2_3_3
t _{1/2} [min] nach 1 Jahr Xeomin® - Therapie	77	76	59	79	Drop out
AK-Titer [mU/ml] nach 1 Jahr Xeomin® - Therapie	1,25	1,2	0,1	1,3	
mAs nach 1 Jahr	1_1_1_1_1	1_2_2_2_1	2_2_2_2_2	1_1_0_0_0	Drop out

HS= Hemispastik; MÄq= Mausäquivalentdosis; mAs= modifizierte Ashworth-Scale; $t_{1/2}$ = halbmaximale Paralysezeit

4.2.1.2 Ergebnisse des Nachweises von AK bei Patienten mit cerebrovaskulärer Spastik

Da alle AK-positiven Spastikpatienten ihre Symptomatik auf der Grundlage eines cerebrovaskulären Insults entwickelten, werden im Folgenden die Behandlungsparameter für diese Patientengruppe noch einmal gesondert dargestellt. Von den 31 Patienten waren 11 weiblich (35,5 %) und 20 männlich (64,5 %). Das durchschnittliche Alter lag bei $63 \pm 10,2$ Jahren. Vor deren Therapieumstellung auf Xeomin® wurden 15 mit Dysport® (48,4 %), 8 mit Botox® (25,8 %) und 4 (12,9 %) mit beiden Präparaten behandelt, 4 Patienten waren de novo auf Xeomin® eingestellt worden (12,9 %). Die durchschnittliche Anzahl an Injektionen lag

- für Botox® bei $20 \pm 11,1$,
- für Dysport® bei $16,9 \pm 16,5$ und
- für beide Präparate bei $14 \pm 10,6$.

Xeomin® wurde in dem Beobachtungszeitraum im Durchschnitt $5 \pm 0,5$ mal injiziert.

Die mittlere Einzeldosis betrug

- für Botox® betrug $505 \pm 99,5$ U,
- für Dysport® $1027,8 \pm 117,9$ U (ÄqD= $342,6 \pm 39,3$ U) und
- für beide Präparate $504 \pm 170,5$ U.

Xeomin® wurde mit einer mittleren Dosis von $332 \pm 86,8$ U injiziert.

Die kumulative Dosis betrug

- für Botox® $10581 \pm 6281,5$ U,
- für Dysport® $16944,4 \pm 16409,49$ U (ÄqD= $5648,2 \pm 5469,83$ U) und
- für beide Präparate $7055,5 \pm 6506,9$ U.

Xeomin® wurde im Beobachtungszeitraum mit einer durchschnittlichen kumulativen Dosis von $1526 \pm 560,6$ U injiziert.

Wie bereits erwähnt hatte ein Patient einen AK-Titer von 1,7 mU/ml. Wegen unzureichenden Respondings schied er als sekundärer Therapieversager aus der Studie aus. Alle anderen AK-positiven Patienten, deren AK-Titer jeweils unter 0,5 mU/ml lag, wiesen ein normales Responding auf. Im 1-Jahresvergleich kam es bei keinem AK-positiven Patienten zu einem Titeranstieg. Bei den im Vergleich zur cerebrovaskulären Spastik jüngeren Patienten mit frühkindlicher Hirnschädigung ($33 \pm 9,7$ Jahre im Vergleich zu $63 \pm 9,6$ Jahren) wurden weder vor noch nach einjähriger Behandlung mit Xeomin® AK im MDT gefunden. 5 Patienten wurden de novo mit Xeomin® behandelt. 4 davon litten an einer cerebrovaskulär bedingten Spastik, eine Patientin an einem frühkindlichen Hirnschaden. Auch bei dieser Patientin war das Alter zu Beginn der Behandlung niedriger als in der Gesamtpopulation ($49 \pm 8,8$ Jahre). Nach einem Jahr Behandlung mit Xeomin® mit einer durchschnittlichen Dosierung von 374 ± 109 U und insgesamt $6,5 \pm 1,8$ Injektionen in Intervallen von $2,8 \pm 0,3$ Monaten wurden keine AK im MDT festgestellt. Auch die klinische Response war in allen Fällen sehr gut (siehe unten).

4.2.1.3 Ergebnisse des Nachweises von AK bei Dystonieklienten

Zum Vergleich mit den Spastikpatienten wurden in dieser Studie 47 Patienten untersucht, welche wegen einer CD mit Xeomin® behandelt wurden. 27 der Patienten waren weiblich und 20 männlich. Das durchschnittliche Alter betrug $46,2 \pm 10,9$ Jahre. 30 hatten einen Torticollis, 17 Patienten andere Formen der Dystonie, wie Laterocollis, dystoner Kopftremor oder segmentale Dystonie. 15 Patienten wurden de novo mit Xeomin® behandelt. Alle übrigen Patienten waren von Botox® auf Xeomin® umgestellt worden. Mittels des MDT wurde die Antikörperfrequenz bei allen Patienten nach drei Jahren Behandlung mit Xeomin® ermittelt. Die 15 de novo mit Xeomin® behandelten Patienten hatten eine durchschnittliche Injektionszahl von $12,5 \pm 2,5$ mit einer durchschnittlichen Einzeldosis von $166,2 \pm 59,2$ U. Daraus ergab sich eine kumulative Dosis von $2046,8 \pm 791,3$ U. Die durchschnittliche Dauer der Injektionsintervalle betrug $2,3 \pm 0,1$ Monate. Die durchschnittliche Dauer der Behandlung mit Xeomin® betrug $42,4 \pm 5,5$ Monate. Das durchschnittliche Alter bei Behandlungsbeginn betrug $49,8 \pm 7,6$ Jahre. 24 der 30 Torticollispatienten wurden von Botox® oder Dysport® auf Xeomin® umgestellt. Sie erhielten vor der Therapieumstellung $21,8 \pm 12,8$ BoNT-Injektionen. Die Gesamtinjektionszahl bis zur AK-Bestimmung lag im Durchschnitt bei $31,8 \pm 13$. Die durchschnittliche Einzeldosis betrug vor der Umstellung auf Xeomin® $235,2 \pm 108$ U, Xeomin® wurde in einer durchschnittlichen Dosis von $210,4 \pm 35,6$ U injiziert. Die gesamte

kumulative Dosis lag im Durchschnitt bei $7349,2 \pm 2795,3$ U. Die Dauer der Behandlung vor der Umstellung auf Xeomin® betrug im Durchschnitt $6,0 \pm 3,5$ Jahre. Die gesamte Dauer der Behandlung lag damit im Durchschnitt bei $8,2 \pm 3,5$ Jahren. Das Alter bei Beginn der Behandlung betrug bei $46,1 \pm 12,5$ Jahre. Im MDT wurden bei 10 Patienten nBoNT-AK nachgewiesen, wobei 2 AK-Titer im Borderline-Bereich lagen. Bei einer Patientin lag ein sTV vor. Diese Patientin wies noch eine Besonderheit auf. Sie wurde seit 3 Jahren wegen eines AKTV nicht mehr mit BoNT behandelt. Damals lag ein Antikörpertiter von 1,9 mU/ml vor, welcher nach der 3-jährigen Therapieunterbrechung persistierte. Die Behandlung mit Xeomin® blieb nach der 3-jährigen Pause ebenfalls wirkungslos. Der Antikörpertiter betrug 2,8 mU/ml. Diese Patientin war zu Behandlungsbeginn 43 Jahre alt und wurde vor Therapieumstellung auf Xeomin® 10 mal mit Dysport® in einer Dosis von 240 U (ÄqD) behandelt, was einer kumulativen Dosis von 2400 U (ÄqD) entsprach. Xeomin® wurde danach 7-mal mit einer Dosis von 300 U injiziert. Daraus ergibt sich eine Gesamtdosis von 4500 U (ÄqD). Das Injektionsintervall lag von der Therapieumstellung bei 3,3 Monaten und danach bei 3,5 Monaten. Insgesamt wurde die Patientin 3,2 Jahre behandelt.

Bei 7 weiteren Dystoniepatienten wurde ein sicherer AK-Nachweis mit Titerwerten über 0,5 mU/ml geführt (Tab. 11). 5 der insgesamt sicher AK-positiven Patienten litten an einem Torticollis, zwei an einem Laterocollis und eine an einer segmentalen Dystonie. Von den 5 Torticollis-Patienten waren 4 weiblich und einer männlich. Vor ihrer Umstellung auf Xeomin® wurden sie im Durchschnitt $26,8 \pm 12,2$ mal mit Xeomin® $12,1 \pm 204$ behandelt. Die Gesamtanzahl der Behandlungen lag damit bei $33,9 \pm 13,3$. Die mittlere Dosis vor der Umstellung auf Xeomin® betrug $311 \pm 229,9$ IU. Xeomin® wurde mit einer durchschnittlichen Dosis von $226,8 \pm 44,9$ IU appliziert. Die kumulative Dosis lag damit vor Xeomin® bei $6598,3 \pm 1865,4$ IU und nach Xeomin® bei $2557,1 \pm 522,9$ IU. Die gesamte kumulative Dosis betrug $9155,4 \pm 2065,4$ IU. Die durchschnittliche Dauer der Injektionsintervalle lag vor Xeomin® bei 2,8 Monaten und während der Xeomin®-Behandlung bei 3,3 Monaten. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug $49,8 \pm 10,8$ Jahre. Die Gesamtdauer der Behandlung betrug $9,7 \pm 2,9$ Jahre. Wenn alle AK-positiven Patienten mit CD betrachtet werden, ergibt sich für sie eine Antikörperprävalenz von 14,8 % (7 von 47). Wenn man nur jene Patienten mit einem Antikörpertiter über 1 mU/ml betrachtet, ergibt sich eine Prävalenz von 6,3 % (3 von 47).

Da nur eine Patientin ein sTV aufwies, lag die Prävalenz für ein sTV bei 2,1 % (1 von 47).

Tabelle 11: Behandlungsparameter sicher AK-positiver Dystoniepatienten

Pat. Nr.	533	493	484	470	458	475	505
Geschlecht	W	W	W	M	W	W	M
Alter	56	51	68	41	46	43	47
Diagnose	Segmentale Dystonie	Torticollis	Torticollis	Torticollis	Torticollis	Torticollis	Laterocollis
Präparat vor Xeomin®	Unbekannt	Dysport®	Botox®	Dysport®	Botox®	Dysport®	Botox®
Anzahl Injektionen vor Xeomin®	unbekannt	18	32	36	38	10	7
Anzahl an Injektionen mit Xeomin®	11	14	12	11	14	7	19
Anzahl an Injektionen gesamt	Unbekannt	32	44	47	52	17	26
Therapiedauer vor Xeomin® [Monate]	Unbekannt	59,4	105,6	118,8	125,4	33	23,1
Therapiedauer mit Xeomin® (Gesamt)	Unbekannt	83,7	128,2	143,5	150,4	76,6	54
Mittleres Injektionsintervall	4,0	2,6	2,9	2,2	2,9	3,3	4,6
Mittlere Einzeldosis vor Xeomin®	Unbekannt	225,2	173,5	200,6	235,9	720	235
Mittlere Einzeldosis mit Xeomin®	237,5	200	193,8	200	240	300	200
Kumulative Dosis vor Xeomin®	Unbekannt	4053,6	5552	7221,6	8964,2	7200	1645
Kumulative Dosis mit Xeomin®	2612,5	2800	2325,6	2200	3360	2100	3800
Gesamte Kumulative Dosis	Unbekannt	6853,6	7877,6	9421,6	12324,2	9300	5445
t _{1/2} [min] nach 3 Jahren Xeomin® Behandlung	71 Minuten	76 Minuten	71 Minuten	69 Minuten	66 Minuten	100 Minuten	84 Minuten
AK-Titer [mU/ml] nach 3 Jahren Xeomin® Behandlung	0,8	1,0	0,8	0,7	0,5	3,8	1,8
Subjektiver Schweregrad der Erkrankung vor Xeomin®	2	2	2	2	3	2	2
Subjektiver Schweregrad der Erkrankung nach 3 Jahren Xeomin® Behandlung	2	2	2	1	2	5	3
TSUI-Wert vor Behandlung mit Xeomin®	10	2	6	2	2	12	2
TSUI-Wert nach 3 Jahren Behandlung mit Xeomin®	2	1	2	2	4	8	2

4.2.2 Klinische Ergebnisse der Xeomin®-Behandlung

4.2.2.1 Klinische Ergebnisse bei Spastikpatienten

Die Auswertung der klinischen Response ergab bei 28 Patienten, dass der Ausgangswert um mindestens einen Schweregrad an mindestens einer Lokalisation gesenkt wurde. Bei 4 Patienten stellte sich keine Veränderung zum Ausgangswert nach einem Jahr Behandlung mit Xeomin® ein. Bei 5 Patienten wurde eine klinische Verschlechterung des Ausgangswertes beobachtet. Bei Patienten, welche das erste Mal mit einem BoNT behandelt wurden, war die Wirkung besonders stark, der Score-Wert verringerte sich teilweise auf die Hälfte des Ausgangswertes. Wenn bei den Patienten schon Kontrakturen vorlagen, konnte auch die Behandlung mit BoNT keine Verbesserung der Spastik bewirken. Auch gab es keine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten bei Therapiebeginn und der Verbesserung des Ausgangswertes. Auffallend ist, dass Patienten, welche kurze Zeit nach ihrer einsetzenden Spastik mit BoNT behandelt wurden, insgesamt ein geringeren Score-Wert aufwiesen als Patienten, welche schon Jahre nach Einsetzen der Spastik behandelt wurden (vergleiche Patient #486 und #423 in Tab 12). Allerdings war die Verbesserung der Spastik in diesen Fällen nicht so ausgeprägt wie bei Patienten, welche schon hohe Score-Werte zu Behandlungsbeginn aufwiesen (siehe Patient #443 in Tab. 12). Bei letzteren war auch nach einjähriger Umstellung auf Xeomin® noch eine Verbesserung ihres Scores zu verzeichnen.

Tabelle 12: Vergleich zwischen Verbesserung des mAs und dem Abstand zwischen Behandlungsstart und Krankheitsbeginn (Beginn der Behandlung 12/2009)

Patientennummer	#486		#423		#443	
Krankheitsbeginn	Aug/2008		Feb/2002		ICP 1972	
ASh-Score Schulter 08 / 09	2	1	2	1	1	1
ASh-Score Ellenbogen 08 / 09	3	2	3	2	2	1
ASh-Score Handgelenk 08 / 09	3	2	4	2	2	1
ASh-Score Finger 08 / 09	2	2	2	2	3	1
ASh-Score Spastischer Daumen 08 / 09	2	1	2	1	2	0

ICP= Infantile Cerebralparese, also bei Geburt oder in den ersten Lebensjahren aufgetretene Spastik

4.2.2.2 Klinische Ergebnisse bei Dystoniepatienten

Die Entwicklung des klinischen Schweregrades war bei den 47 im 3-jährigen Behandlungszeitraum erfassten Dystoniepatienten heterogen. Bei 31 Patienten konnte der TSUI-Wert nach zwei Jahren Behandlung mit Xeomin[®] um mindestens 2 Punktwerte gesenkt werden. Im Durchschnitt verbesserte er sich um $3,7 \pm 2,3$ Punktwerte. Bei 11 Patienten blieb die Punktzahl im TSUI-Score über 3 Jahre Behandlung mit Xeomin[®] gleich. In dieser Gruppe befanden sich allerdings keine Patienten, welche de novo mit Xeomin[®] behandelt wurden. Bei einem Patienten konnte nach zwei Jahren Behandlung mit Xeomin[®] keine Änderung seines Scores nachgewiesen werden, nach 3 Jahren verbesserte sich der Score-Wert jedoch um 4 Punkte. Bei 4 Patienten war der TSUI-Wert nach zwei Jahren Behandlung höher als der Ausgangswert. In zwei dieser Fälle verbesserte er sich nach dem 3. Jahr. Die restlichen zwei Patienten zeigten nach dem 3. Jahr den gleichen Score wie nach dem zweiten Jahr.

4.2.3 Korrelation der Ergebnisse des MDT mit der klinischen Response

Der Vergleich der Ergebnisse der AK-Bestimmung im MDT mit der klinischen Response ergibt eine hohe Übereinstimmung beider Parameter sowohl bei den Patienten mit Spastik als auch bei den Patienten mit CD. Es fällt allerdings auf, dass die klinische Response in dieser Studie erst ab einem AK-Titer über 1,8 mU/ml deutlich nachlässt. Unter den 5 Spastik-Patienten mit einem erhöhten AK-Titer hatte nur eine Patientin einen AK-Titer über 1,3 mU/ml. Bei ihr fand sich ein sehr hoher Score-Wert im mAs. Bei den 4 restlichen Patienten lag der AK-Titer zwischen 0,1 und 1,3 mU/ml. Hier zeigt sich ein deutlich geringerer mAs und bei zwei dieser Patienten wurde eine Verbesserung des Wertes nach einem Jahr Behandlung mit Xeomin[®] registriert. Bei 4 Patienten des gesamten Patientenkollektivs wurde eine Verschlechterung des Score-Wertes nach einem Jahr Behandlung mit Xeomin[®] festgestellt, obwohl bei diesen Patienten im MDT keine Antikörper nachweisbar waren. Bei insgesamt vier Patienten fand sich nach einem Jahr Behandlung mit Xeomin[®] keine Veränderung im mAs. Drei dieser Patienten waren im MDT negativ, während ein Patient einen niedrigen AK-Titer aufwies, welcher einen AK-Titer unter 1,0 mU/ml im MDT aufwies. Die Auswertung der Korrelation von klinischem Schweregrad mit dem AK-Befund von 37 Spastik-Patienten, bei denen beide Parameter im 1-jährigen Behandlungszeitraum erfasst wurden konnten, sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Korrelation der MDT-Ergebnisse mit dem mAs

		MDT				Gesamt
		Negativ	Titer < 0,5 mU/ml	Titer < 1,0 mU/ml	Titer > 1,0 mU/ml	
Responding	Verbesserter Ashworth-Wert	24	0	0	3	27
	Unveränderter Ashworth-Wert	3	1	0	0	4
	Verschlechterter Ashworth-Wert	4	0	0	0	4
Gesamt		31	1	0	3	35

4.3 Klinische Nebenwirkungen der Xeomin®-Behandlung

Bei den in dieser Studie untersuchten Patienten traten im gesamten Beobachtungszeitraum der Xeomin®-Behandlung keine anticholinergen Nebenwirkungen, wie Dysphagie, Energie oder Kraftverlust, Schmerzen oder Muskelsteifheit im ganzen Körper, Verdauungsstörungen, Geschmacksveränderungen, Stimmveränderungen, Verschwommensehen, Erbrechen, Obstipation, Grippe-ähnliche Symptome oder allergische Reaktionen auf.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

Die Bestimmung von nBoNT-AK mit dem MDT erfordert eine längere Einarbeitungsphase, in der die Präparation des Mausdiaphragmas und der Umgang mit dem Messsystem und der Auswertungs-Software trainiert werden müssen. Unabdingbar ist es, eine kontinuierliche Kontraktion des Hemidiaphragmas von 3 Stunden zu erreichen, um eine sichere Detektion auch von niedrigen AK-Titern zu gewährleisten.

Eine Messung wurde abgebrochen, wenn nach 180 Minuten die Kontraktion noch über dem halben Maximum lag. Dann war eine Wiederholung der Messung mit einer Serum-Verdünnung von 1:2 erforderlich (Göschel et al. 1997). Ursprünglich wurde nur das linke Diaphragma für den MDT benutzt (Göschel et al. 1997, Wohlfarth et al. 1997). Da eigene Messungen mit dem rechten Hemidiaphragma ebenfalls eine konstante Kontraktion ergaben, wurden in dieser Studie beide Diaphragmahälften verwendet. Damit konnte die Anzahl an Versuchstieren um 50 % reduziert werden.

Ein wichtiger Aspekt des MDT ist die ausreichende Oxygenierung des Zwerchfell-Präparates.

Ein häufig zu beobachtendes Phänomen bestand darin, dass sich nach dem Einstellen der Vorspannung auf ca. 5 mN die primären Kontraktionswerte von ca. 25 mN nicht aufrecht erhalten ließen. Der Grund war ein starker Anstieg der Vorspannung innerhalb von ca. 10 Minuten auf bis zu 15 mN. Nach weiteren 10-20 Minuten fiel die Vorspannung meist wieder auf ihren ursprünglichen Wert zurück, wobei allerdings auch die Kontraktion mit abfiel.

Unter der Vorstellung, dass während der Zwerchfell-Präparation ein hypoxischer Zustand eintritt, welcher bei normaler Badoxygenierung nicht rasch genug ausgeglichen wird, verstärkten wir die Oxygenierung und konnten dadurch die Kontraktion bei niedriger Vorspannung < 5 mN stabil halten.

Vor dem Badtausch gegen die proteinhaltige BoNT-Lösung musste die Carbogenzufuhr allerdings wieder reduziert werden, um übermäßige Schaumentwicklung zu vermeiden. Dabei konnte die Kontraktion des Präparates wieder abfallen.

Ohne eine ausreichende Oxygenierung würde sich die Kontraktion des Präparates nicht stabil halten lassen, sondern unter den optimalen Bereich von 15-20 mN sinken. Umgekehrt würde bei zu hoher Carbogenzufuhr das Präparat zwar sehr gut oxygeniert sein und eine hohe Kontraktionskraft erreichen, nach dem Badwechsel gegen Patientenserum jedoch soviel Schaum entstehen, dass ein Kontakt des Präparates mit der atmosphärischen Luft droht, was die Kontraktion vorübergehend stark ansteigen lässt und die Werte verfälscht. Daher war stets darauf zu achten, dass die ausreichende Oxygenierung mit kleinstmöglicher Schaumentwicklung realisiert wird.

Trotz dieses Vorgehens mussten wir, um zu verhindern, dass das Präparat mit dem Schaum in Kontakt kommt, den Schaum mittels Einmalpipette absaugen und nach Abschleudern das Serum wieder dem Bad hinzufügen.

Da wir in einigen Fällen versehentlich EDTA-Blut eingesandt bekamen, haben wir geprüft, ob nach Dialyse und Entfernung des dadurch entstandenen Koagulates noch Serum-AK nachweisbar sind. Positive Ergebnisse erhielten wir bei diesen Messungen in keinem Fall. Um zu testen, ob das der Antikoagulation geschuldet ist, haben wir das EDTA-Blut von Normalprobanden in gleicher Weise behandelt und nachträglich mit Standard-Pferde-Antiserum eines bekannten Titers gemischt. Durch die MDT-Messung konnte hierbei der AK-Titer exakt reproduziert werden, was zeigt, dass es prinzipiell möglich sein sollte, in EDTA-

Blut AK nachzuweisen. Sekundär antikoaguliertes EDTA-Blut wurde jedoch sicherheitshalber in die vorliegende Studie nicht einbezogen. Ein wichtiger Aspekt der Ergebnisbewertung der nBoNT-AK-Nachweisverfahren ist die Festlegung des Grenzwertes für einen sicheren AK-Nachweis. In der Literatur gibt es dazu unterschiedliche Angaben, die zwischen 0,3 und 0,8 mU/ml schwanken (Kranz et al. 2008). Dabei spielt die klinische Relevanz niedriger AK-Titer eine weitere wichtige Rolle. So fanden Kranz et al. (2008) bei über 40% von MDT-AK-positiven Dystoniepatienten eine gut klinische Response, wenn sie einen Grenzbereich (Borderline-Werte) zwischen 0,4 und 0,8 mU/ml als AK-positiv bewerteten. Um keine potenzielle Beeinträchtigung der Therapieresponse durch nBoNT-AK zu übersehen, haben wir für die vorliegende Studie den Boarderline-Bereich bis an die untere Grenze der Testsensitivität, d.h. zwischen 0,1 und 0,5 mU/ml verschoben.

5.1.2 Patientenbehandlung

Bei der BoNT-Therapie und der Beurteilung ihrer Effektivität sind 2 metabolische Aspekte zu beachten. Der erste betrifft die Dosierung der unterschiedlichen BoNT-Präparate. Insbesondere beim Wechsel von Dysport® auf Botox® und Xeomin® ist der im Einleitungskapitel 1.1.8 beschriebene Konversionsfaktor zu berücksichtigen. Er liegt nach Literaturangaben in dem weiten Bereich von 1,57 bis 6,0 (Wohlfarth et al. 2009; Ruban et al. 1993; Durif 1995; Sampaio et al 1995; Nüßgens et al. 1997). Wir haben für die Berechnung der Mausäquivalenzdosis einen in der Literatur (Übersicht in Dressler and Benecke 2007) üblichen Konversionsfaktor zwischen Dysport® und Botox® von 3,0 und zwischen Botox® und Xeomin® von 1,0 verwendet. Bei der Einschätzung des Behandlungserfolgs ist es zudem wichtig, sowohl die objektive Beurteilung durch den Arzt als auch die subjektive Bewertung durch den Patienten zu berücksichtigen. In der vorliegenden Studie wurde mit Blick auf die Rolle der n-BoNT-AK das Hauptaugenmerk allerdings auf die objektive neurologische Beurteilung anhand der mAs für Spastik-Patienten und der TSUI-Scale für Dystoniepatienten gelegt.

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Effektivität bei UMNS-Plus-Symptomatik

Wie in der Einleitung erläutert, besteht die Spastik aus einer Plus/Positiv- und einer Minus/Negativ-Symptomatik. Die Plus-Symptomatik zeichnet sich durch einen erhöhten Muskeltonus in Form von Spastizität (geschwindigkeitsabhängige Muskeltonuserhöhung) aus.

Hierzu zählen Spasmen, gesteigerte Muskeleigenreflexe, pathologische Reflexe, Massenbewegungen, assoziierte Haltungen und Bewegungen sowie Kontrakturen. Die Minus-Symptomatik umfasst die Lähmung, die vermehrte Erschöpfbarkeit und die verminderte Flexibilität (Wissel 2010). Mittels BoNT ist es möglich, die Plus/Positiv-Symptomatik günstig zu beeinflussen und zwar unabhängig von dem BoNT-Präparat. Die Effektivität der Behandlung hängt neben den präparatunabhängigen auch von präparatabhängigen Faktoren ab. Zu ihnen zählen die Professionalität und Kontinuität der Durchführung von physiotherapeutischen Maßnahmen, die Genauigkeit der Injektionen und die psychische Situation des Patienten. In mehreren Fällen führte sogar die Jahreszeit und damit die Temperatur zu einer veränderten Wirksamkeit.

Hier ist zu erwähnen, dass gerade die psychosozialen Faktoren in ihrer Auswirkung auf die subjektiv wahrgenommene Effektivität erheblich zwischen den unterschiedlichen Krankheitsbildern variieren. Während keiner der Patienten mit Spastik in der vorliegenden Studie einen subjektiven Wirkungsverlust bemerkte, kam es bei einigen Patienten mit CD zur subjektiven Wirkungsreduktion, obwohl keine nBoNT-AK nachgewiesen wurden und der subjektive Eindruck der Wirkung für die Klinikangestellten unverändert war. Auffallend war weiterhin, dass fast jeder der Patienten, die über eine verminderte Response berichteten, Gründe für eine Aggravation hatten. Häufig handelte es sich um Frauen mittleren Alters mit Rentenbegehren und starkem psychologischem und/oder sozialem Stress (zerstrittene Familienverhältnisse, Alkoholabusus). Ein weiterer Aspekt besteht darin, dass jüngere Frauen häufig mehr auf ihr äußeres Erscheinungsbild, insbesondere im Kopfbereich achten, als ältere Patienten nach Schlaganfall. Außerdem ist die subjektive Wirksamkeit der Therapie bei Patienten mit Spastik oft höher als bei Patienten mit CD. Die Behandlung kann bei diesen Patienten zu einer deutlich höheren Erleichterung der Lebensumstände führen, so dass sie eine leichte Wirkungsreduktion gar nicht wahrnehmen bzw. sie es nicht wahrhaben wollen, damit sie weiterhin die Therapie erhalten.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Effektivität von Xeomin® bei der Behandlung von Patienten mit Spastik der oberen Extremität im Erwachsenenalter, überwiegend ausgelöst durch einen Schlaganfall, sehr hoch ist, wie die Auswertung mittels des mAs ergab. Um die spezifische Wirksamkeit von Xeomin® gegenüber den anderen BoNT-Präparaten (Botox® und Dysport®) zu vergleichen, wurde ein Großteil der Patienten von einem dieser Präparate auf Xeomin® umgestellt. Vor der Umstellung wurde der mAs erfasst, und regelmäßig bei jeder Xeomin®-Behandlung über 1 Jahr bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Patienten selbst

nach langjähriger Therapie mit einem anderen BoNT-Präparat nach der Umstellung auf Xeomin® immer noch einen zum Teil sogar zusätzlichen therapeutischen Nutzen hatten. Die Effektivität von Xeomin® war also gleichwertig zu Dysport® oder Botox®, in einigen Fällen sogar höher. Außerdem zeigte sich, dass die Nebenwirkungsrate von Xeomin® sowohl bei Patienten mit Spastik als auch bei Patienten mit CD sehr gering war. Die Nebenwirkungen bei Spastik-Patienten resultierten meist aus einer Überdosierung des BoNT oder einer zu hohen Injektion in einen bestimmten Muskel. Hierbei handelte es sich um passagere Nebenwirkungen, welche nach einigen Wochen durch das Abklingen der BoNT-Wirkung sistierten. Bei der CD kam es nur sehr selten zu Nebenwirkungen wie Dysphagie und Schmerzen im Bereich der Injektion oder zu muskulären Schmerzen, obwohl der sensible Halsbereich besonders für Dysphagien prädispositioniert. In einer großen Studie mit 463 CD-Patienten aus 11 europäischen Ländern und 51 verschiedenen Kliniken zur Erfassung der Effektivität und Nebenwirkungsrate von Xeomin® (damals noch als NT 201 bezeichnet), hatte sich bereits gezeigt, dass Xeomin® hinsichtlich Sicherheit und Tolerabilität dem Präparat Botox® gleichwertig ist (Benecke et al. 2005). Dies wird durch unsere Studie bestätigt und gilt nach unseren Daten auch für den Vergleich mit Patienten, welche mit dem Präparat Dysport® behandelt wurden. Dass die klinische Wirkung von Xeomin® bei identischen Injektionsparametern den Vergleichs-Präparaten mit gleicher biologischer Wirksamkeit vergleichbar ist, zeigt, dass diese nicht von der Menge an Komplexproteinen im Präparat abhängt. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, bestehen die Komplexproteine des BoNT aus Hämagglutininen und einem nicht-toxischen, nicht-hämagglutinierenden Protein. Sie vermitteln dem BoNT einen Schutz vor der Zerstörung im Magen-Darm-Trakt und die Aufnahme ins Blut über die Darmmukosa. Da therapeutisches BoNT/A direkt in den Zielmuskel injiziert wird, tragen die Komplexproteine nicht zur Wirksamkeit bei, können aber Zielpunkt für AK sein.

Theoretisch sollte komplexfreies BoNT/A schneller in die Nachbarmuskeln diffundieren als BoNT mit Komplexproteinen. Dies könnte in der Praxis dazu führen, dass Nebenwirkungen aufgrund höherer Einzeldosis pro Muskel (starke Parese) in Nachbarmuskeln sowie in größeren Muskeln häufiger auftreten. In unserer Studie wurde jedoch im Gegenteil gefunden, dass solche Nebenwirkungen ausblieben und Xeomin® eine gute Wirksamkeit sowohl in kleinen Muskelgruppen, wie bei der CD, als auch in großen Muskeln, wie bei der Spastik, aufwies. In einer Studie von Wohlfarth et al. (2007) wurde bestätigt, dass die Diffusion des BoNT nicht von den Komplexproteinen beeinflusst wird. Dies liegt daran, dass sich bei

physiologischem pH die Komplexproteine abtrennen, worauf die Toxinmoleküle freigesetzt werden und in den Zielmuskel sowie in Nachbarmuskeln diffundieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Injektion von BoNT ist bei der praktischen Anwendung die gewählte Menge des Toxins und seine Verdünnung, die wiederum das injizierte Volumen pro Muskel bestimmt. In dieser Arbeit wurden die Injektionen von 3 verschiedenen Ärzten in unterschiedlicher Weise vorgenommen: (1) hohe Dosis in hoher Verdünnung, (2) niedrige Dosis in hoher Verdünnung und (3) mittlere Dosis in niedriger Verdünnung.

Die korrekte Lage der Kanüle während der Injektion wurde durch Ultraschalluntersuchung kontrolliert. Hierbei bestätigte sich, dass die größeren Muskeln (z.B. M. biceps brachii) und Muskeln, welche relativ isoliert am Unterarm liegen (M. brachioradialis, M. brachioradialis, M. pollicis longus), sehr genau injiziert werden konnten, während die Fingerflexoren weniger exakt zu treffen waren. Durch die Diffusion des BoNT wurden trotzdem alle Zielmuskeln von ausreichender BoNT-Menge erreicht.

Die anhand der mAs ermittelte klinische Verbesserung der Spastik unterschied sich bei allen drei behandelnden Ärzten nicht wesentlich. Ein leicht verbessertes Outcome hatten die Patienten, welche mit mittlerer Dosis in geringer Verdünnung injiziert wurden. Allerdings hatte der entsprechende Arzt auch die längste Erfahrung mit der BoNT-Behandlung. Als Resümee kann generell geschlussfolgert werden, dass die Durchführung der BoNT-Injektion bei der Spastik der oberen Extremität eine eher untergeordnete Rolle hinsichtlich der Beurteilung der Therapie-Effektivität spielt. Diese Injektionen sind damit besonders geeignet, um jüngere Ärzte in der Aus- und Weiterbildung mit der praktischen Durchführung der BoNT-Behandlung vertraut zu machen. Durch die vielen fraktionierten hoch verdünnten Injektionen ist eine Überdosierung eines Muskels kaum möglich und hätte auch keine so gravierenden unerwünschten Auswirkungen wie es z.B. beim Blepharospasmus der Fall ist (starke Ptose).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Fridman et al. (2010) behandelte die Frage nach der Wirksamkeit von BoNT-Injektionen (Botox[®]) bei Spastikpatienten nach Schlaganfall. Hier wurde die Effektivität von BoNT nicht anhand des mAs erfasst, sondern anhand von Greif- und Bewegungsübungen, welche in einem bestimmten Zeitraum ausgeführt werden mussten. Es zeigte sich, dass die Patienten, welche mit BoNT behandelt wurden, diesen Test schneller und mit weniger Aufwand meisterten als unbehandelte Patienten. Diesen Test könnte man nach Ansicht der Autoren auf viele Lebenssituationen anwenden, um die Effektivität von

BoNT bei Spastik zur Bewältigung von Alltagsaufgaben einzuschätzen. In unserer Studie haben wir die mit Xeomin[®] behandelten Patienten anamnestisch nach der Wirksamkeit der Behandlung gefragt und gleichzeitig den mAs erhoben. Im Allgemeinen war die Wirkung nach Therapieumstellung auf Xeomin[®] gleich geblieben. In einigen Fällen verbesserte sich die Spastik im mAs sogar im Vergleich zum vorherigem Präparat, jedoch ergaben sich in der subjektiv mitgeteilten Funktionalität der spastischen Extremität keine gravierenden Unterschiede. Der Grund hierfür ist vermutlich in dem zeitlichen Abstand der Erfassung des mAs zu sehen. Während die anamnestische Befragung des Patienten sich auf die Phase der größten Wirksamkeit bezieht, d.h. 2-3 Wochen post injectionem, wurde der mAs immer direkt vor den BoNT-Injektionen erfasst. Dadurch sollte eine Langzeitprognose der Spastik unter abgeklungenem BoNT-Einfluss erstellt werden. Vom Patienten war dies allerdings in vielen Fällen nicht exakt nachzuvollziehen, sondern nur schwer zu beurteilen, da die BoNT-Wirkung nach einiger Zeit nachließ und der Patient somit zwischenzeitlich eine subjektive Verschlechterung seiner Spastik verspürte.

5.2.2 Nebenwirkung (nBoNT-AK-Bildung)

Aufgrund seiner zuverlässigen Wirkung ist BoNT zu einem Standardtherapeutikum in der symptomatischen Behandlung der Spastik nach Schlaganfall geworden, nachdem es in der Therapie der CD bereits seit längerer Zeit den Goldstandard darstellt. Insbesondere bei CD-Patienten, bei denen alle anderen Therapiemöglichkeiten ausgeschöpft sind, ist BoNT die letzte, nichtinvasive Therapiemöglichkeit vor der ultima ratio, der intracraniellen Schrittmacherimplantation. Die häufigste Ursache des TV von BoNT ist das Auftreten von nAK gegen das Toxin. Eine hochsensitive Methode zum Nachweis dieser AK ist der MDT. Hiermit ist es potentiell frühzeitig möglich, niedrigtitrige AK zu detektieren und einem sTV vorzubeugen.

Mit dem MDT können AK ab in einer Größenordnung von 0,3 mU/ml Serum sicher nachgewiesen werden. In dieser Konzentration fallen in der Mehrzahl der Fälle noch keine klinischen Wirkungsreduktionen auf. In der Literatur wird ein AK-Titer von 1 mU/ml als Grenzwert angegeben, bei dem es fast immer zu einem TV kommt (Göschel et al. 1997). Dies konnten wir in unserer Studie nicht bestätigen. Auch Patienten mit einem AK-Titer von über 1 mU/ml haben noch günstig auf das BoNT/A reagiert. Teilweise konnte sich ihr TSUI-Score, welcher Ausdruck für die klinische Wirksamkeit der Therapie ist, nach der Umstellung auf Xeomin[®] noch verbessern. Eine Absinken des Titors nach einem Jahr Behandlung mit

Xeomin[®] konnte jedoch nicht festgestellt werden. Es ergibt sich also die Möglichkeit, dem Prozess sich entwickelnder AK entgegen zu steuern, wenn schon geringe Titer detektiert werden können. Brin et al. (2008) haben den AK-Titer bei CD-Patienten nach einem Jahr Behandlung mit dem Präparat Botox[®] mittels MPA gemessen. Die AK-Rate betrug in ihrer Studie 1,2 %. Einige AK-positive Patienten wurden zur Zeit der Blutentnahme vom Untersucher als Responder bewertet, andere wiesen den typischen Verlauf eines sTV auf, mit Therapieversagen nach wenigen oder nur einer Injektion. Allerdings gab es auch Patienten, welche als AK-negativ im MPA getestet wurden und trotzdem einen Wirkungsverlust der Therapie zeigten. Ein Grund könnte die zu geringe Sensitivität des MPA sein, um schon im frühen Stadium einen niedrigen AK-Titer zu erfassen, wenn sich noch keine klinischen Auswirkungen zeigen. Im Gegensatz zu der Studie von Brin et al. (2008) wurde von uns der AK-Titer mittels des MDT gemessen, der eine deutlich höhere Sensitivität besitzt und schon geringe AK-Konzentrationen von 0,3 mU/ml detektiert (Sesardic et al. 2004). Würden alle AK-Titer über der von uns als Grenzwert gesetzten Schwelle von 0,1 mU/ml gewertet, für Spastik und CD, ergäbe sich eine Positivrate von 14,6 %. Diese ist allerdings weit höher als das Auftreten von einem sTV. Wenn nur Patienten mit einem Titer über 1,0 mU/ml einbezogen werden, weist unsere Studie eine AK-Rate von 8,5 % auf. Klinisch betrug die TV-Rate 2,4 %. Die Diskrepanzen der AK-Raten könnten vor allem auf die unterschiedlichen Sensitivitäten der Testsysteme zurückzuführen sein. 2001 verglichen Dressler und Dirnberger den MDT mit dem Immunoprecipitationstest (IPT). In dem Vergleich wurde deutlich, dass der MDT eine signifikant höhere Sensitivität als der IPT hat. Allerdings handelte es sich bei den Studienpatienten um Patienten mit sehr geringen AK-Titern. 2001 waren Dressler und Dirnberger der Meinung, dass der IPT den MDT aufgrund seiner einfacheren, schnelleren und billigeren Durchführung sowie dem Verzicht auf Versuchstiere eines Tages ablösen könnte. 10 Jahre später ist der Maus-Letalitäts-Test (MLT) immer noch der Goldstandard für die Detektion von nBoNT-AK und für die Messung der biologischen Aktivität von BoNT-Chargen. Aufgrund seines hohen Aufwands und seiner Komplexität ist der MDT bisher nicht zum Goldstandard in der AK-Detektion oder Chargenkontrolle geworden. Der IPT wird heutzutage kaum angewandt und konnte sich aus Sicht der Tierschützer bedauerlicherweise nicht als Standard etablieren, vermutlich aufgrund zu hoher falsch-positiver Resultate durch Nachweis nicht-neutralisierender AK.

Schon in den späten 1990er Jahren wurden Versuche unternommen, einen erhöhten AK-Titer zu reduzieren um einem sTV vorzubeugen bzw. es zu wieder aufzuheben. Die Versuche bestanden in einer Kombination aus Plasmapherese und Immunoabsorption (Naumann et al.

1998), in der Applikation von i.v.-Immunglobulinen (Dressler et al. 2000) oder in anderen Methoden der AK-Reduktion. Sie waren allerdings auf Dauer nicht praktikabel bzw. blieben erfolglos (Dressler et al. 2002). Deshalb ist es von bedeutender Wichtigkeit, das Auftreten von AK früh zu verhindern. Dies ist auch eine Bedingung für die Ausweitung der Therapie mit BoNT in der Zukunft. Hierzu gibt es mehrere Strategien (Dressler 2008):

(1) Die Protein-Ladung (protein load) wird gesenkt. Man vermutet, dass die Menge an biologisch inaktiven BoNT-Molekülen in einem Präparat, die durch den Produktionsprozess, Transport und Lagerung entstehen, mit dem Risiko des Auftretens von nBoNT-AK zusammenhängen. Xeomin[®] hat die höchste SBA (Spezifische Biologische Aktivität) und damit die geringste Antigenität.

(2) Die Entfernung der Komplexproteine. Dadurch wird die Antigenität, wie bei Xeomin[®] der Fall, stark vermindert.

(3) Andere Strategien, wie die Erhöhung der Affinität des BoNT gegenüber seinem Ziel, um damit die Menge an benötigtem BoNT zu reduzieren und dadurch die Antigenität zu verringern, befinden sich momentan noch in der Erforschung. Eine weitere Möglichkeit ist die transdermale Applikation, z.B. zur Therapie der Hyperhidrosis an der Fußsohle. Auch eine BoNT-Markierung, um die injizierten Moleküle in bildgebenden Verfahren darzustellen und damit auch genauer applizieren zu können, ist zu erwägen. Das könnte zu einem besseren Outcome des Patienten (wünschenswert insbesondere bei der Therapie des Schreibkrampfes und der spastischen Dysphonie) führen. Ready-to-use Präparate von BoNT, wie es sie zurzeit nur das BoNT/B NeuroBloc[®]/MyoBloc[®] gibt, und einfachere Lagerungsmöglichkeiten, wie es Xeomin[®] bietet, sich weitere Optionen zur Reduktion der AK-Bildung. Nur bei Xeomin[®] ist es möglich, das Präparat bei Zimmertemperatur aufzubewahren. Die anderen BoNT/A-Präparate müssen gekühlt werden, da sie sonst ihre Wirkung verlieren und dem Patienten bei der Injektion Schmerzen entstehen (Dressler 2008).

2009 hat Dressler Ergebnisse von Studien vorgestellt, welche die Wirkungs- und Nebenwirkungsrate von Xeomin[®] im Vergleich mit anderen BoNT/A Präparaten zum Thema haben. In einer Studie wurden 263 Patienten mit unterschiedlichen, BoNT-behandelbaren Krankheiten untersucht, welche zuvor mindestens ein Jahr mit Botox[®] therapiert wurden und danach auf Xeomin[®] dosisäquivalent 1:1 umgestellt wurden. Hinsichtlich Wirkung und Nebenwirkungen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Aufgrund der geringen Molekülgröße und dadurch erhöhten Diffusionskapazität im Muskel und Gewebe könnte Xeomin[®], gerade im Halsbereich bei der Therapie der CD, zu einer erhöhten Nebenwirkungsrate führen. Dies hat sich in Dresslers Studie nicht bestätigt. Auch traten keine Nebenwirkungen auf, welche sich in ihrer Ausprägung oder Schwere von denen bei Patienten, welche mit Botox[®] oder Dysport[®] therapiert wurden, unterschieden. Der Autor begründet dieses, wie bereits oben erwähnt (Wohlfarth et al. 2007), mit einer möglicherweise schnelle Dissoziation des BoNT von seinen Komplexproteinen nach der Injektion. Er postuliert auch die 1:1-Konversion der Dosis von Botox[®] und Xeomin[®], da die Potenz beider Präparate in seiner Studie identisch war. In die Studie eingeschlossen waren auch Patienten, welche off-label behandelt wurden, darunter Spastikpatienten. Auch bei ihnen gab es keine Unterschiede zwischen der vorherigen Behandlung mit Botox[®] und der Behandlung mit Xeomin[®], was die These unterstützt, dass Xeomin[®] in seiner Wirkung und Nebenwirkungsrate mit Botox[®] vergleichbar ist (Dressler 2009).

Allerdings ist nicht nur das BoNT-Präparat und seine Zusammensetzung für die Entstehung von AK verantwortlich. Auch die Menge, welche appliziert wird, die Frequenz der einzelnen Injektionen, sog. Booster-Injektionen, prädisponierende genetische Faktoren wie das Geschlecht und das Alter bei Therapiebeginn sowie die Gesamtdauer der Behandlung könnten eine Rolle spielen. In zahlreichen vorherigen Studien wurde versucht, diese Risikofaktoren zu erfassen, mit dem Ziel, das Auftreten von AK zu vermindern. Gerade die Patienten, welche eine Spastik nach einem Schlaganfall erlitten haben, sind in der Regel älter, die Therapie ist längerfristig angesetzt und sie benötigen aufgrund der größeren Zielmuskeln eine deutlich höhere Einzeldosis als es z.B. bei Patienten mit CD der Fall ist. In Anbetracht der Risikofaktoren, hohe BoNT-Einzeldosis, kurzes Injektionsintervall, hohes Patientenalter bei Therapiebeginn und ggf. geringe spezifische biologische Aktivität des Präparates, wurde eine Zunahme des AKTV bei Spastik-Patienten vermutet (Dressler and Benecke 2007). Dies würde eine große klinische Bedeutung haben, weil es die Therapiemöglichkeiten limitiert. In bisher vorliegenden Studien über AKTV bei BoNT-Therapie der Spastik nach Schlaganfall wurde die Bestimmung der AK mit dem MLT oder dem Maus-Protektionstest (MPT) vorgenommen (Brashear et al. 2002, Turkel et al. 2002, Bakheit et al. 2004, Gordon et al. 2004, Yablon et al. 2007). Damit wurden AK-Frequenzen zwischen 0,1 – 0,6 % der untersuchten Patienten gefunden. In unserer Studie wurden mit dem sensitiven MDT bei 5 von 35 getesteten Patienten mit Spastik, d.h. bei 14,2 %, nBoNT/A-AK nachgewiesen. Von diesen Patienten erreichten drei Patienten einen Titer von über 1 mU/ml. Dies entspricht einer Prävalenz von 7,5 % . Zwei dieser Patienten zeigten weiterhin ein gutes Responding auf die

Behandlung mit BoNT/A. Wenn nur die Klinik eines sekundären Non-Responding sowie hohe Werte im MDT berücksichtigt werden, dann läge die Prävalenz des AKTV bei 2,8 % (1/35). Damit ist sie zwar etwas höher als in den oben erwähnten Studien, doch eben so niedrig wie in anderen Studien, wo die AK-Prävalenz von Spastik-Patienten mittels des MDT untersucht worden sind (Müller et al. 2009). Damit ist anzunehmen, dass unsere Werte durch die höhere Sensitivität des MDT etwas höher liegen als in den mit weniger sensitiven Tests durchgeführten Studien (Brashear et al. 2002, Turkel et al. 2002, Bakheit et al. 2004, Gordon et al. 2004, Yablon et al. 2007).

Dieses Ergebnis ist allerdings nicht mit der obigen Hypothese vereinbar, dass aufgrund der erwähnten Risikofaktoren für das Auftreten von nBoNT-AK ein höheres Risiko für das Entstehen eines AKTV bei Spastik-Patienten besteht. Auch ist die Prävalenz im Vergleich zu Patienten mit CD niedrig. Letztere wurde in verschiedenen Untersuchungen mit 1,2 - 10 % angegeben (Hambleton et al. 1992, Jankovic and Schwartz 1993, Zuber et al. 1993, Greene et al. 1994a, Duane et al. 1995, Göschel et al. 1997, Kessler et al. 1999, Brin et al. 2008). Im Durchschnitt wurde daher bei CD-Patienten bisher von einem ca. 5 %-igen Risiko für ein AKTV ausgegangen (Kessler et al. 1999).

Auch diese Zahl wurde in unserer Studie nicht bestätigt. Die CD-Patienten hatten eine AK-Prävalenz von 2,1 %, was größenordnungsmäßig mit der neueren Studie von Brin et al. (2008), die eine AK-Prävalenz von 1,2 % ergab, übereinstimmt.

Wie lässt sich die Frage, warum die Post-Stroke-Patienten trotz zahlreicher Risikofaktoren eine niedrige AK-Prävalenz aufweisen, beantworten? Das mittlere Alter bei Therapiebeginn lag in unserer Studie bei $63 \pm 10,2$ Jahren und damit deutlich höher als z.B. bei Patienten mit CD oder sCP, bei denen eine höhere Prävalenz an AKTV beschrieben wurde (Göschel et al. 1997, Herrmann et al. 2004). Das Durchschnittsalter der AK-positiven Patienten war mit $65,4 \pm 9,6$ Jahren nahezu identisch mit dem Durchschnitt der Gesamtpopulation. Somit konnte in dieser Studie der Risikofaktor, welcher in älteren Arbeiten ermittelt wurde (Jankovic und Schwartz 1998, Kessler et al. 1999) nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung wäre ein aktiveres Immunsystems bei jüngeren Patienten. Das würde auch die deutlich höhere AK-Prävalenzrate bei Kindern mit sCP erklären, die allerdings zusätzlich eine höhere Einzeldosis/kg KG BoNT erhielten (Herrmann et al. 2004). Die Einzeldosis stellt potentiell einen AK-Risikofaktor dar. Sie lag aber in unserer Studie bei AK-positiven Patienten kaum über dem Durchschnitt. Nur 2 Patienten erhielten mit 500 U/ml Xeomin® eine etwas höhere Dosis als der Durchschnitt (300U/ml). Alle AK-positiven Patienten wurden mit $58,6 \pm 36,6$

Monaten länger als der Durchschnitt behandelt ($49 \pm 48,4$ Monate). Die Injektionsintervalle befanden sich im unteren Bereich des Durchschnitts. Vier Patienten wiesen eine überdurchschnittliche Anzahl an Injektionen auf (>20). Drei von fünf AK-positiven Spastikpatienten wurden zuvor mit Dysport[®] therapiert, was eine niedrige SBA als Risikofaktor in unserer Studie bestätigt (Critchfield 2002, Atassi 2004, Dressler and Hallett 2006, Dressler and Benecke 2007). Das Geschlecht scheint, da ein ausgeglichenes Verhältnis bestand, keinen Einflussfaktor darzustellen (Dressler and Dirnberger 2000).

Ein weiterer potenzieller Einflussfaktor auf die AK-Bildung betrifft die Injektionsstelle des BoNT. Inwiefern die Injektionsstelle mit der Prävalenz von nBoNT-AK zusammenhängt, ist noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet, dass es durch die zentraler liegenden Muskeln bei der CD und das erhöhte Vorkommen an Lymphgewebe zu einer beschleunigten Immunisierung kommen kann. In einer neueren Arbeit von Antonucci (Antonucci et al. 2008) wurde ermittelt, dass sich BoNT/A zu anderen Synapsen über microtubulären retrograden Transport ins ZNS ausbreiten kann. Das könnte auch für das periphere Nervensystem zutreffen, allerdings nicht in einer so großen räumlichen Ausbreitung (Eleopra et al. 2004). Dies könnte zu einer zusätzlichen Stimulation des Immunsystems führen.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Studie ist der Befund, dass sich der Schweregrad der Erkrankung bei den CD-Patienten schon bei einem deutlich geringeren Anstieg des AK-Titers erhöhte, als es bei den Spastikpatienten der Fall war. Spastikpatienten mit einem Titer von über 1,0 mU/ml wiesen z.T. noch keinerlei Verschlechterung der Wirkung auf, sowohl subjektiv anamnestisch als auch objektiv im mAs, während ein Anstieg des AK-Titers bei CD-Patienten über 1,0 mU/ml immer auch klinisch mit einer Verschlechterung des TSUI-Scores einherging. Dies könnte mit einer stärkeren Präsenz von Immunzellen am Injektionsort zusammenhängen.

Die relativ geringe Patientenzahl der vorliegenden Studie lässt vermuten, dass eine zu hohe Prävalenz an nBoNT-AK ermittelt wurde. 2007 wurde von Yablon et al. im Rahmen einer gepoolten Datenanalyse aus 3 Studien eine AK-Prävalenz bei Post-Stroke-Spastikpatienten von 0,5 % ermittelt. Zu beachten ist dabei, dass in allen 3 Studien der MPT zur AK-Bestimmung verwendet wurde. Außerdem waren diese Patienten im Durchschnitt nur zweimal mit BoNT behandelt worden. Ein weiteres Problem beim Vergleich älterer Prävalenzdaten ist, dass zwischenzeitlich, zunächst in den USA ein neues Botox[®] mit niedrigem protein-load auf den Markt gebracht wurde. In diesem Zusammenhang verglichen Jankovic et al. (2003) die AK-Raten zwischen CD-Patienten, welche entweder mit dem

Original-Botox[®] von vor 1998 (mit 25ng Protein/100 Einheiten) oder mit dem neueren Botox[®] (mit 5 ng Protein/100 Einheiten) behandelt wurden. Es stellte sich erwartungsgemäß heraus, dass das Risiko, AK gegen BoNT/A zu entwickeln, gemessen mit dem MPT, reduziert war, und zwar sogar um den Faktor 6. Hiermit war klar geworden, dass die Menge an Protein in einem BoNT/A-Präparat direkt mit der Gefahr der AK-Bildung zusammen hängt und damit als hoher Risikofaktor angesehen werden muss. Im Hinblick auf die Wirksamkeit und die Rate an Nebenwirkungen ergaben sich in dieser Studie keine Unterschiede zwischen den beiden Botox[®]-Präparaten. In der SCP-Studien von Herrmann et al. (2004) wurde noch das alte Botox[®]-Präparat verwendet, da die Zulassung für das neue Botox[®]-Präparat in Europa noch fehlte. Dies ist eine mögliche Erklärung für die hohe AK-Prävalenz in der Studie.

In unserer Xeomin[®]-Studie konnten wir bei auf Xeomin[®] umgestellten Spastikpatienten eine zweite AK-Bestimmung nach einem Jahr Behandlung mit dem Ausgangswert vergleichen und dadurch Titerveränderungen im 1-Jahres-Verlauf verfolgen. Von den fünf initial AK-positiven Patienten fiel einer aufgrund eines sTV aus der Studie heraus. Bei ihm konnte daher der Verlaufswert nach einem Jahr nicht erhoben werden. Bei drei Patienten, mit einem initial erhöhtem AK-Titer verringerte sich der Titer in der zweiten Messung leicht. Allerdings lag der Titer immer noch oberhalb des Borderline-Bereiches von 0,1-0,5 mU/ml. Bei einem Patienten erhöhte sich der Titer nach einem Jahr Behandlung mit Xeomin[®]. Das Responding war jedoch weiterhin gut und der Schweregrad sogar teilweise verbessert. Dieser Patient wurde mit 85 Monaten länger als der Durchschnitt behandelt, die Injektionsintervalle lagen mit 2,6 Monaten unter dem Durchschnitt und der Patient hatte mit 28 Injektionen die zwar höchste Anzahl an Injektionen unter den AK-positiven Patienten erhalten. Außerdem erhielt dieser Patient die höchste mittlere Einzeldosis vor der Umstellung auf Xeomin[®]. Dieses Ergebnis deckt sich mit Erfahrungen anderer Autoren, dass nBoNT-AK nicht immer eine gute Therapieresponse ausschließen (Kranz et al. 2008). Insgesamt zeigen die Ergebnisse der 5 AK-positiven Spastikpatienten jedoch, dass Xeomin[®] zu einem Absinken des AK-Titers führen kann. Allerdings ist es nicht in jedem Fall möglich, ein drohendes sTV mittels Umstellung auf Xeomin[®] zu verhindern. Dennoch sollte man vor einem Therapieversuch mit einem BoNT/B-Präparat die Umstellung auf Xeomin[®] versuchen und die Ergebnisse in einer weiterführenden Studie dokumentieren.

Im Vergleich zu Studien, in denen eine hohe AK-Prävalenz mitgeteilt wurde (sCP:Herrmann et al. 2004, CD:Zuber et al. 1993, Kessler et al. 1999) waren in der vorliegenden Studie Risikofaktoren wie Therapiedauer, BoNT-Einzeldosis und Kumulativdosis bei den Patienten

mit Spastik noch deutlich höher. Dennoch war die AK-Prävalenz niedriger, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Brin et al. (2008) steht und zeigt, dass nBoNT/A-AK, insbesondere bei Post-Stroke-Patienten ein seltenes Ereignis darstellt. Das Immunisierungsrisiko und damit das Risiko eines AKTV scheint daher bei diesen Patienten gering zu sein.

Das Alter der Patienten bei Therapiebeginn war in dieser Studie ebenfalls kein Risikofaktor für das Auftreten von nBoNT-AK. Am ehesten als Risikofaktor anzusehen sind die kumulative Dosis und die Gesamtdauer der Therapie.

5.3 BoNT außerhalb der Zulassung

Wie beschrieben kann BoNT aufgrund seines Wirkungsmechanismus in vielen verschiedenen Situationen angewendet werden. Die Zulassungslage in Deutschland ist allerdings stark begrenzt und unbefriedigend. Dies liegt vor allem an den erforderlichen, umfangreichen und kostspieligen Studien, welche von den Unternehmen finanziert werden müssen, um eine Zulassungserweiterung für das Medikament zu erhalten. Außerhalb der Zulassung wird BoNT dennoch für zahlreiche Indikationen eingesetzt. Dabei ist die Datenlage der klinischen Studien für einige Anwendungsgebiete durchaus aussagekräftig. So wurde z.B. zur Behandlung der spasmodischen Dysphonie BoNT/A schon 1984 erstmalig erfolgreich eingesetzt (Blitzer et al. 1986). Weiterhin existiert für diese Indikation eine Phase-Ib-Studie (Trough et al. 1991) sowie eine Datensammlung von über 900 Patienten, welche zum Teil über 12 Jahre mit BoNT behandelt wurden (Blitzer et al. 1998). Eine Phase-III-Studie zum Einsatz von BoNT bei Stimmtremor ungeklärter Ätiologie wurde von Adler et al. (2004) durchgeführt. Ein zweites Beispiel betrifft die Therapie des Schreibkrampfes mit BoNT. Hierzu gibt es bereits eine Vielzahl an Studien, welche die hervorragenden BoNT-Wirkungen bei der Behandlung des Schreibkrampfes und der Musikerdystonie dokumentieren. Es existieren drei frühe plazebokontrolliert Studien (Phase Ib) aus den 1990er Jahren, in denen gezeigt werden konnte, dass durch BoNT-Injektionen in relativ niedriger Dosis das Schriftbild bei 30-80% der Behandelten verbessert werden konnte (Tsui et al. 1993; Yoshimura et al. 1992; Cole et al. 1995). Außerdem ergab eine große Phase-III-Studie mit 167 Patienten und einer Dauer von teilweise mehr als 10 Jahren, dass sich das Schriftbild bei 46 % der Patienten normalisierte, bei 10% verbesserte und nur bei 21 % nicht gebessert werden konnte (Marion et al. 2003). Auch eine neuere Studie von Das et al. (2006) zeigte beim Schreibkrampf mit BoNT-Therapie hervorragende Ergebnisse. Die Autoren ermittelten sogar genaue Mengenangaben von BoNT für einzelne Muskeln und fanden, dass Frauen und Patienten mit Handgelenksflexion ein

besseres Ergebnis aufweisen als Patienten mit dystonem Tremor im akuten Krampf (Das 2006). Auch bei der mit dem Schreibkrampf eng verwandten Musikerdystonie führten in einer Studie BoNT-Injektionen in die Arm- und die Schultermuskulatur zu Verbesserungen. 69 % berichteten von einer initialen Verbesserung und bei 36 % hielt die Wirkung nach wiederholten Injektionen an (Schuele et al. 2005). Doch auch für diese Indikationen existiert keine Zulassung der BoNT-Therapie in Deutschland. Dabei ist die Behandlung mit BoNT bei Patienten mit Schreibkrampf zurzeit die einzige wirksame Therapieoption. Aus diesem Grund wird sie auch in vielen Zentren als Off-label-Therapie angeboten.

Bei der Behandlung der Spastik mit BoNT ist die Zulassungssituation aufgrund von drei Aspekten noch unverständlicher:

- (1) Die Behandlung der Spastik mit BoNT ist zugelassen für Patienten, bei welchen sich die Spastik nach einen Schlaganfall entwickelt hat, nicht aber für Patienten, bei denen die Spastik durch MS, ein Schädel-Hirn-Trauma oder Rückenmarkserkrankungen bedingt ist.
- (2) Die Behandlung der Spastik der oberen Extremität nach Schlaganfall mit BoNT ist in Deutschland zugelassen, die Injektion in die unteren Extremitäten, Rumpf oder Rücken nicht.
- (3) Die Behandlung der Spastik der unteren Extremität ist bei Infantiler Cerebralparese ausschließlich für Botox[®] zugelassen.

Zwar wird die Ursache der Spastik durch BoNT nicht behandelt, eine kausale Therapie ist jedoch häufig noch nicht möglich. Die lokale BoNT-Applikation stellt aber eine noch wirksame und nach heutigem medizinischem Wissensstand ungefährliche symptomatische Therapieoption dar. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kann BoNT die Blut-Hirn-Schranke aufgrund seiner Molekülgröße nicht passieren, und da keine centripetale Wanderung des BoNT oberhalb des α -Motoneurons stattfindet, kann BoNT auch keine Schädigungen des Rückenmarks herbeiführen (außer bei direkter Rückenmarks-Injektion). Auch eine versehentliche Injektion des BoNT in ein größeres Gefäß ist äußerst selten und leicht durch kurze Aspiration vor der Injektion zu vermeiden. In unserer Klinik hatten wir noch keinen einzigen Fall von systemischen Nebenwirkungen des BoNT durch Fehlinjektionen in ein größeres Gefäß zu verzeichnen. Auch die AK-Frequenz ist bei der

Therapie mit modernen BoNT/A-Präparaten sehr gering. Das jüngste Präparat Xeomin® enthält keine Komplexproteine und verringert dadurch die Antigenität erheblich.

Die Wirksamkeit einer BoNT-Therapie bei MS wird durch zahlreiche überzeugende Studien belegt. Exemplarisch sollen dafür zwei Studien stehen. In einer placebokontrollierten Doppelblindstudie bei MS-Patienten mit schwerer Adduktorenspastik zeigte BoNT eine signifikante Wirkung nicht nur auf den Muskeltonus, sondern auch auf den Pflegeaufwand, welcher mittels eines Scores ermittelt wurde. Im Ergebnis dieser Studie wurden zur Pflege der BoNT-behandelten Patienten statt zwei Pflegekräfte nur noch eine benötigt (Snow et al. 1990). In einer zweiten placebokontrollierten Doppelblindstudie mit 126 MS-Patienten, die über einen signifikanten funktionellen Effekt der BoNT-Therapie berichteten, war die primäre Zielvariable eine subjektive Veränderung in einem Behinderungsbereich. Dabei konnte eine subjektive Verbesserung in der Haltungsanomalie des Arms nachgewiesen werden (Brasher et al. 2002).

Für die Behandlung der Spastik nach Schlaganfall ist es besonders bedauerlich, dass die Zulassung auf die obere Extremität beschränkt ist. Die häufig parallel vorliegende Beinspastik muss daher zurzeit durch eine Kombination mit oraler spasmolytischer Therapie, die der BoNT-Therapie unterlegen ist (Simpson et al. 2009), behandelt werden (Benecke 2009).

Zahlreiche Studien bestätigten die Wirksamkeit der BoNT-Therapie bei Dystonie auch außerhalb der engfassten Zulassungskriterien. Bei Kopfschmerzen und Migräne ist die Datenlage derzeit noch nicht eindeutig (Stolze et al. 2006), so dass Empfehlungen vom Ausgang laufender Studien abhängig gemacht werden müssen. Weitere Anwendungsgebiete versprechen ein hohes Potential für die Behandlung mit BoNT zu besitzen. Dazu gehören die Achalasie, die Analfissur und die Hypersalivation.

5.4 Ausblick

Damit ein Medikament in Deutschland offiziell für eine spezielle Indikation zugelassen und eine Verordnungsfähigkeit zu Lasten der GKV erreicht wird, bedarf es umfangreicher und kostenintensiver Studien. Wird darüber hinaus, wie es bei BoNT der Fall ist, eine breite Off-label-Anwendung bereits routinemäßig praktiziert, sparen die Firmen oft die zusätzlichen Kosten für eine Zulassungserweiterung.

Dadurch kommt es jedoch zunehmend zu Konflikten mit den Krankenkassen, die ebenfalls nach Möglichkeiten suchen, Zahlungen zu reduzieren. Hierbei sind Off-label-Verschreibungen aus ihrer Sicht gute Einsparquellen. Am Ende ist der Patient der Leitragende, da er eine medizinisch sinnvolle und effiziente Therapie möglicherweise nicht mehr erhält. Gerade bei der Behandlung der Spastik ist eine regelmäßige Injektion von BoNT essentiell, um eine dauerhafte und anhaltende Verbesserung der Bewegungsfunktion zu erreichen. Hier erweist sich die Erweiterung der Zulassung auf die Behandlung der Beinspastik, die wie bereits erwähnt häufig mitbetroffen ist, als dringend geboten, um eine weniger effektive und stärker nebenwirkungsbehaftete Medikation mit oraler antispastischer Therapie zu vermeiden.

Aus unserer Studie ergibt sich, dass die Umstellung auf Xeomin[®] sowohl bei Patienten mit CD, insbesondere aber bei Patienten mit Spastik der oberen Extremität nach Schlaganfall eine Verbesserung der klinischen Situation bewirkt. Ob dies zumindest teilweise auf einem Placeboeffekt beruht, weil die Patienten sich mit einem neuen, komplexproteinfreien BoNT/A-Präparat eine Verbesserung ihrer Symptomatik besser vorstellen können als mit demselben Präparat, welches sie schon seit vielen Jahren bekommen, oder ob es sich tatsächlich um einen therapeutischen Effekt des komplexproteinfreien BoNT/A handelt, kann nur in zukünftigen placebokontrollierten Studien ermittelt werden.

Die Studie zeigt auch, dass bei Patienten mit initial hohen AK-Titern ($> 1\text{mU/ml}$) die Therapieumstellung auf Xeomin[®] kurzfristig keine weitere Verbesserung der Symptomatik zur Folge hat. Ein hoher AK-Titer scheint auf die Blockierung zahlreicher Epitope des Toxinkomplexes hinzuweisen und sich nicht auf Epitope der Komplexproteine zu beschränken. Dennoch könnte Xeomin[®] als Reservepräparat angesehen werden. Dies könnte vor allem für Patienten zutreffen, die einen Borderline-AK aufweisen. Hier könnten niedrigtitrige AK, welche bei weiterer Progredienz zu einem AKTV führen würden, durch die Umstellung auf Xeomin[®] nicht weiter indiziert werden, falls sie an die Komplexproteine binden. Dies wäre eine Möglichkeit, ein drohendes TV zu vermeiden oder zu vermindern. Hierzu werden Langzeitergebnisse dieser Patienten Aufschluss geben können. Problematisch ist, dass die Detektion sehr niedriger AK-Titer nur mittels des MDT möglich ist. Dieser Test ist aufwändig und benötigt viel Erfahrung, um eine sichere Messung zu gewährleisten. Außerdem müsste jeder Patient regelmäßig untersucht werden. In großen Zentren mit mehr als 1000 Patienten stellt dies ein logistisches Problem dar. Durch die Methodik ergäbe sich

auch ein erhöhter personeller Aufwand, was erhöhte Kosten nach sich zieht, so dass die Suche nach alternativen Testsystemen eine Aufgabe der Zukunft bleibt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Xeomin® ein sicheres und effektives Medikament zu Behandlung von hyperkinetischen cholinerg-getriggerten Krankheitsbildern darstellt. Vom Sicherheitsaspekt her ist Xeomin® den anderen in Deutschland zugelassenen BoNT/A-Präparaten vergleichbar. Auch die Wirksamkeit von Xeomin® hat sich in dieser und in anderen Studien als gleichwertig herausgestellt. Deshalb kann Xeomin® nicht nur als Alternativpräparat bei Spastik der oberen Extremität angesehen werden, sondern sollte bei schon heute ausreichend vorhandener Studienlage auch für weiterführende Indikationen freigegeben werden.

6 Zusammenfassung

Botulinumneurotoxin (BoNT) ist ein wirksames, effektives und sicheres Therapeutikum zur Behandlung von Krankheitsbildern, welche mit cholinerg Hyperaktivität einhergehen.

Diese Arbeit behandelte die Effektivität, sowie die Sicherheit bei der Behandlung von Spastik (überwiegend nach Schlaganfall) im 1-Jahres-Verlauf im Vergleich zur 3-jährigen Behandlung der CD mit dem neuem komplexproteinfreien BoNT/A-Präparat (Xeomin®).

Um die Sicherheit der Behandlung, d.h. das Auftreten von nBoNT-AK (neutralisierenden Antikörpern) zu beurteilen, verwendeten wir bei beiden Patientengruppen den Maus-Diaphragma-Test (MDT), welcher derzeit die höchste Sensitivität besitzt.

Zur Objektivierung der Behandlungseffektivität diente die mAs bei den Spastik-Patienten, der TSUI-Score bei den Dystonie-Patienten.

Aufgrund der im BoNT enthaltenen Fremdproteine hat die BoNT-Therapie eine immunisierende Wirkung, welche durch die notwendige repetitive Applikation verstärkt wird.

Durch die Bildung von nBoNT-AK kann es bei den Patienten zu einem sekundären Therapieversagen (sTV) kommen, womit die Therapie in ihrer Wirkung limitiert wird. Risikofaktoren für das Auftreten von nBoNT-AK sind hohe BoNT-Einzeldosen, niedrige Injektionsintervalle, Booster-Injektionen und eine niedrige spezifische biologische Aktivität

(SBA) des Präparates. Einige Autoren geben als zusätzliche Risikofaktoren das Alter zu Therapiebeginn und die Dauer der Therapie an.

Da Patienten mit CD in der Regel jünger sind als die Spastik-Patienten und eine deutlich geringere Dosis an BoNT erhalten, würde man vermuten, dass in der Spastikgruppe mehr Fälle von sTV durch hohe AK-Titer auftreten als in der CD-Gruppe. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen, wurden nur solche Patienten mit CD in die Studie einbezogen, welche schon im dritten Jahr Xeomin[®] erhielten und somit eine den Spastik-Patienten ähnliche kumulative Xeomin[®]-Dosis aufwiesen.

Nach Abzug der während der Studie ausgeschiedenen Patienten (drop-out) setzte sich das Untersuchte Patientengut aus 35 Spastikpatienten (davon 5 de novo Xeomin[®]-Patienten und 30 Patienten, die von den konventionellen BoNT/A-Präparaten Botox[®] oder Dysport[®] auf Xeomin[®] umgestellt wurden) und 47 CD-Patienten (davon 15 de novo Xeomin[®]-Patienten) zusammen.

Bei 14,2 % aller Patienten mit Spastik wurde ein erhöhter AK-Titer gefunden, allerdings ein hoher Titer (> 1 mU/ml) nur bei 8,5 % und ein sTV nur bei 2,8 % der Patienten. Von den CD-Patienten hatten 17 % einen erhöhten AK-Titer, davon >1 mU/ml 6,3 % und 2,1 % ein sTV.

Es zeigte sich also, dass die Häufigkeit von nBoNT-AK bei CD und Spastik nahezu identisch ist. Somit konnte das Alter als Risikofaktor für das Auftreten nBoNT-AK ausgeschlossen werden. Die geringfügig höhere Häufigkeit von nBoNT-AK bei CD-Patienten könnte z.B. mit der ausgeprägten Lymphdrainage der Injektionsstellen bei den von der CD betroffenen Muskeln erklärt werden.

Kein CD- und Spastik-Patient, der de novo mit Xeomin[®] behandelt wurde, entwickelte unter der Therapie mit Xeomin[®] nBoNT-AK. Aufgrund der geringen Anzahl dieser Patienten und des besonders bei den Spastik-Patienten kurzen Beobachtungszeitraums müssen allerdings längere Follow-up Studien abgewartet werden, bevor endgültige Aussagen zur AK-Bildung unter Xeomin[®]-Therapie gemacht werden können.

Weiter zeigte sich, dass eine Umstellung auf Xeomin[®] ein sTV nicht verhindern konnte, wenn es schon zu längerfristig erhöhten AK-Titern mit TV gekommen war. Dies lässt auf multiple Epitope des BoNT als Target für AK schließen.

Xeomin® stellte sich in dieser Studie als effektives Therapeutikum sowohl bei der Spastik als auch bei der CD dar. Auch bei Off-label-Injektionen zeigten sich keine unerwünschten Nebenwirkungen und die Wirksamkeit war vergleichbar zu den herkömmlichen BoNT/A-Präparaten.

Aufgrund der großen Muskelgruppen der unteren Extremität, die häufig bei Spastik nach Schlaganfall mit betroffen ist, sollte es eine Erweiterung der Zulassung für Xeomin® auf die untere Extremität geben. Wegen des Fehlens von Komplexproteinen und der dadurch geringeren Immunisierungsgefahr wäre Xeomin® sehr gut geeignet, auch in höheren Dosen, welche bei der Injektion von BoNT in die großen Muskeln der unteren Extremität erforderlich sind, eingesetzt zu werden. Damit wäre auch die Gefahr des Auftretens von AKTV geringer einzuschätzen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekülstruktur von BoNT/A. Blau: Schwere Kette, Grün: Leichte Kette (de.academic.ru)	4
Abbildung 2: Schematischer Ablauf der normalen Transmitterexozytose (links) sowie der Wirkung von BoNT an der motorischen Endplatte (rechts) (Dickerson and Janda 2006).....	9
Abbildung 3: Fehlstellungen der oberen Extremität bei Spastik (www.Xeomin.de).....	37
Abbildung 4: Verteilung der Patienten nach ihrer Krankheitsdiagnose.....	39
Abbildung 5: Verteilung der Patienten nach ihrem Behandlungsregime.....	40
Abbildung 6: MDT-Messplatz mit 4 Organbädern und eingespannten Hemidiaphragma-Präparaten.....	46
Abbildung 7: Kontraktionsverlauf bei einer BoNT-Konzentration von 0,5 ng/ml A7.....	48
Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurve zur Ermittlung der Dosis für die Antikörperbestimmung mit der BoNT/A7-Charge.....	52
Abbildung 9: Antikörper-Kalibrierungskurve für BoNT-A7.....	54

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der kommerziell erhältlichen BoNT-Präparate (modifiziert nach Dressler et al. 2007)	15
Tabelle 2: Klinische Anwendungsgebiete von BoNT (modifiziert nach Homann et al. 2002 und Charles 2004)	19
Tabelle 3: Zugelassene Indikationen für die Behandlung mit BoNT-Präparaten in Deutschland (modifiziert nach Ceballos-Baumann 2010)	20
Tabelle 4: Positiv/Plus- und Negativ/Minus- Symptomatik bei Spastik (modifiziert nach Ward 2008).....	30
Tabelle 5: Indikationen für eine antispastische Therapie (modifiziert nach Ward 2008)	33
Tabelle 6: Behandlungsmöglichkeiten der Spastik (modifiziert nach Ward 2008)	34
Tabelle 7: Einteilung der modifizierten Ashworth-Scale	41
Tabelle 8: Testserien zur Bestimmung der optimalen halbmaximalen Hemidiaphragma-Paralysezeit.....	52
Tabelle 9: Messserien zur Bestimmung der Antikörper-Kalibrierungskurve	53
Tabelle 10: Patientencharakteristika der AK-positiven Spastikpatienten	56
Tabelle 11: Behandlungsparameter sicher AK-positiver Dystoniepatienten	60
Tabelle 12: Vergleich zwischen Verbesserung des mAs und dem Abstand zwischen Behandlungsstart und Krankheitsbeginn (Beginn der Behandlung 12/2009).....	61
Tabelle 13: Korrelation der MDT-Ergebnisse mit dem mAs.....	63

9 Literaturverzeichnis

1. Adler CH, Bansberg SF, Hentz JG et al. Botulinumtoxin type A for treating voice tremor. Arch Neurol 2004; 61 : 1416-1420.
2. Amersdorfer P, Wong C, Chen S, Smith T, Deshpande S, Sheridan R, Finnern R, Marks JD, Molecular characterization of murine humoral immune response to botulinumneurotoxin type A binding domain as assessed by using phage antibody libraries. Infect Immun, 1997 65, 3743-3752
3. Antonucci F, Rossi Ch et al. Long-Distance Retrograde Effects of Botulinum Neurotoxin A. J Neurosci, 2008; 28(14):3689-3696
4. Arnon SS, Honey, infant botulism and the sudden infant death syndrome. West J Med 1980;132(1):58-9
5. Atassi MZ., Basic Immunological aspects of botulinum toxin therapy. Movement Disorders 2004 Vol 19, Suppl 8, S.68-S84
6. Atassi MZ, Dolimbek BZ. Mapping of the antibody-binding regions on the HN-domain (residues 449-859) of botulinum neurotoxin A with antitoxin, protein J. 2004;23(1):39-52.
7. Atassi MZ, Dolimbek GS, Deitiker PR, Aoki KR, Dolimbek BZ Submolecular recognition profiles in two mouse strains of non-protective and protective antibodies against botulinum neurotoxin A. Mol Immunol 2005. 42; 1509-1520
8. Atassi MZ, Oshima M. Sturcture, activity and immune (T and B cell) recognition of botulinum neurotoxins. Crit Rev Immunol 1999. 19, 219-260
9. Bakheit AM, Fedorova NV, Skoromets AA, Timerbaeva SL, Bhakta BB, Coxon L. The beneficial antispasticity effect of botulinum toxin type A is maintained after repeated treatment cycles. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004, 75; 1558-1561

10. Barnes MP. Neurological rehabilitation – a working party report of the british society of rehabilitation medicin and the neurological alliance. British Society of Rehabililitation Medicin, London 1992
11. Bartels F, Bergel H, Bigalke H, Frevert J, Halpern J, Middlebrook J. (1994) Specific antibodies against the Zn^{2+} -binding domain of clostridial neurotoxins restore exocytosis in chromaffin cells treated with tetanus and botulinum A neurotoxin. J. Biol. Chem. 269, 8122-8127
12. Basu J, Shen N, Dulubova I, Lu J, Guan R, Guryev O et al. A minimal domain resposible for Munc13 activity. Nat Struct Mol Bil. 2005;12:1017-1018
13. Benecke R. 2009 (Kommentar zu Simpson et al. 2009, siehe Nr.120)
14. Benecke R, Dressler D, Kunesch E, Probst T. Use of botulinum toxin the the treatment of muscle pain. Schmerz 2003 17, 450-458
15. Benecke R, Jost WH, Kanovsky P, Ruzicka E, Comes G, Grafe S. A new botulinum toxin type A free of complexing proteins for treatment of cervical dystonia. Neurology 2005; 64:1949-1951
16. Bigalke H, Shoer L.F. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 145 Bacterial Protein Toxins, Chapter 18, Springer-Verlag 2000
17. Binder WJ, Brin MF, Blitzer A, Schoenrock LD, Pogoda JM. Botulinum toxin type A (BOTOX[®]) for treatment of migraine headaches: an open-label study. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2000; 123, 669–676
18. Binz T, Rummel A. Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. J Neurochem. 2009 Jun;109(6):1584-95.
19. Black JD, Dolly JO. Interaction of 125I-labeled botulinumtoxins with nerve terminals.I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. J Cell Biol. 1986a;103(2):521-34
20. Black JD, Dolly JO. Interaction of 125I-labeled botulinumtoxins with nerve terminals.II. Autoradiographic evidence for ist uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. J Cell Biol. 1986b; 103(2):535-44

21. Blitzer A, Brin MF, Fahn S et al. Botulinum toxin (BOTOX) for the treatment of „spastic dysphonia“ as part of a trial of toxin injections for the treatment of other cranial dystonias. *Laryngoscope* 1986; 96: 1300-1301
22. Blitzer A, Brin MF, Stewart CF. Botulinumtoxin management of spasmodic dysphonia (laryngeal dysphonia): a 12-year experience in more than 900 patients. *Laryngoscope* 1998; 108:1435-1441
23. Borodic GE, Acquadro M, Johnson EA. Botulinum toxin therapie for pain and inflammatory disorders: mechanisms and therapeutic effects. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001 ;10(8):1531-44
24. Brashear A, Gordon MF, Elovic E et al. Intramuscular injection of botulinumtoxin for the treatment of wrist and finger spasticity after a stroke . *N Engl J Med* 2002; 347(6): 395-400.
25. Brin MF, Comella CL et al. Long-Term Treatment with Botulinum Toxin Type A in cervical dystonia has low Immunogenicity by mouse protection assay. *Mov Dis*. 2008;23,No.10,pp.1353-1360
26. Brin MF, Dressler D, Aoki R. Pharmacology of botulinum toxin therapie. In: Jankovic J, Comella C, Brin MF, (eds.) *Dystonia: Etiology, clinical features and treatment*. Ohiladelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. pp 93-112.
27. Brin MF, Fahn S, Moskowitz C et al. (1986) Localized injections of botulinum toxin for the treatment of focal dystonia and hemifacial spasm. *Adv Neurol*. 50, 599-608
28. Bülbring E. (1946) Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation in the rat. *Br J Pharmacol*. 1, 38-61
29. Ceballos-Baumann A. Update Botulinumtoxin in der Nervenheilkunde. *Nervenheilkunde* 2010;29:501-608
30. Charles PD. Botulinum neurotoxin serotype A: a clinical update on non-cosmetic uses. *Am J Health Syst Pharm*. 2004 15;61(22 Suppl 6):S11-23
31. Chaddock JA, Marks PM. (2006) Clostridial neurotoxins: structure-function led design of new therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 63, 540-551

32. Cole R, Hallett M, Cohen LG. Double-blind trial of botulinumtoxin for the treatment of focal hand dysonia. *Mov Disord* 1995; 10: 466-471
33. Critchfield J. (2002) Considering the immune response to botulinum toxin. *Clin J Pain*. 18, 133-141
34. Das CP, Dressler D, Hallett M. Botulinumtoxin therapy of writer's cramp. *Eur J Neur*. 2006, 13. (Suppl.1):55-59
35. de Paiva A, Meunier FA, Molgo J, Aoki KR, Dolly JO. Funktional repair of motor endplates after botulinum type A poisoning: Biphasic sqitch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96:3200-3205
36. Dickerson TJ, Janda KD. The use of small molecules to investigate molecular mechanisms and therapeutic targets for treatment of botulinum neurotoxin A intoxication. *ACS Chem Biol*. 2006 Jul 21;1(6):359-69.
37. Dolimbek GS, Dolimbek BZ, Aoki KR, Atassi MZ. Mapping of the antibody and T cell recognition profiles of the HN domain (residues 449-859) of the heavy chain of botulinum neurotoxin A in two high-responder mouse strains. *Immunol Invest*. 2005 34, 119-142
38. Dolly JO, Black J, Williams RS et al. Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature* 1984; 307(5950):457-60
39. Dolly JO, Aoki KR. The structure and mode of action of different botulinum toxins. *Eur Neur* 2006, 13(suppl. 4) : 1-9
40. Dressler D, Adib Daberi F. Safety aspects of high dose Xeomin therapie. *J Neurol* 2006;253(Suppl. 2):II/141
41. Dressler D, Benecke R. Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. *Disabil Rehabil*. 2007;29, 1761-1768
42. Dressler D, Benecke R. Autonomic side effects of botulinum toxin type B treatment of cervical dystonia and hyperhidrosis. *Eur Neurol* 2003;49:34-38

43. Dressler D, Bigalke H. Botulinum toxin antibody type A titres after cessation of botulinum toxin therapy. *Mov Disord* 2002;17:170-173
44. Dressler D, Botulinum toxin drugs: future developments. *J Neural Transm* 2008;115:575-577
45. Dressler D, Dirnberger G. Botulinum toxin therapie: Risk faktors for therapy failure. *Mov Disord* 2000;15(Suppl. 2):51
46. Dressler D, Dirnberger G. Botulinumtoxin Antibody Testing: Comparison between the Immunoprecipitation Assay and the Mouse Diaphragm Assay. *Eur Neurol* 2001;45:257-260
47. Dressler D, Eckert J, Kukowski B, Mayer BU. Somatosensorisch Evozierte Potentiale bei Schreibkrampf: Normalisierung pathologischer Befunde unter Botulinum Toxin Therapie. *Z EEG EMG* 1993;24:191
48. Dressler D, Eleopra R. Clinical use of non-A-botulinumtoxin: Botulinumtoxin type B. *Neurotox Res* 2006;9:121-125
49. Dressler D, Hallet M. Immunological aspects of Botox[®], Dysport[®] and Myobloc[™]/Neurobloc[®]. *Eur J Neurol*. 2006 13, 11-15
50. Dressler D, Lange M, Bigalke H. Mouse diaphragm assay for detection of antibodies against botulinum toxin type B. *Mov Disord*. 2005 20, 1617-1619
51. Dressler D, Rothwell JC, Bigalke H. The sternocleidomastoid test: An in vivo assay to investigate botulinum toxin antibody formation in man. *J Neurol* 2000; 247:630-632
52. Dressler D, Zettl U, Bigalke H, Benecke R. Can i.v. immunoglobulin improve antibody mediated botulinum toxin therapy failure? *Mov Disord* 2000;15:1279-1281
53. Dressler D. Clinical presentation and management of Antibody-induced failure of botulinum toxin therapy. *Mov Disord*. 2004;19(Suppl 8):92-100
54. Dressler D. Complete secondary botulinum toxin therapy failure in blepharospasmn. *J Neurol* 2000;247:809-810

55. Dressler D. Dysport produces intrinsically more swallowing problems than Botox: Unexpected results from a conversion factor study in cervical dystonia. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2002;73:604
56. Dressler D. Dysport® produces intrinsically more swallowing problems than Botox®: unexpected results from a conversion factor study in cervical dystonia. J Neurol Neurosurg Psych 2002;72:459-462
57. Dressler D. Immunological aspects of Botulinum toxin Therapy. Eur J Neurol. 2009
58. Dressler D. New formulation of BOTOX®: Complete antibody-induced therapy failure in hemifacial spasmen. J Neurol. 2004;251:360
59. Dressler D. Routine use of Xeomin® in patients previously treated with Botox®:long term results. 2009 Eur J Neurol 16(suppl. 2) :2-5
60. Dressler D., Rothwell JC. Electromyographic quantification of the paralysing effect of Botulinum toxin. Eur Neurol 2000; 43: 13-16.
61. Dressler D, Benecke R. Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. Disabil Rehabil 2007 29(23): 1761-1798
62. Duchen LW. An electron microscopic study of the changes induced by botulinum toxin in the motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. J Neurol Sci 1971 ; 14:47-60
63. Duchen LW. Changes in the electron microscopy structure of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse after the local injection of botulinum Toxin. J Neurol Sci 1971 ; 14: 61-74
64. Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, Sudhof TC, Rizo J. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. Proc. Natl. Acad Sci USA.2007;104:2697-2702
65. Durif F. Clinical bioequivalence of the current commercial preparations of botulinum toxin. 1995 ; Eur J Neurol 2:17-18
66. Elopura R, Tugnoli V, Quattrale R et al. Different types of botulinum toxin in humans. Mov Disord 2004. 19 (Suppl. 8) :53-59

67. Erbguth F, Claus D, Engelhardt A, Dressler D. Systemic effect of local botulinum toxin injections unmasks subclinical Lambert-Eaton myasthenic syndrom. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1993;56:1235-1236
68. Erbguth J.F. Historical Notes on Botulism, *Clostridium botulinum*, Botulinum Toxin, and the Idea of the Therapeutic Use of the Toxin. *Movement Disorders* Vol. 19, Suppl. 8, 2004, pp. S2–S6
69. Fasshauer D, Bruns D, Shen B, Jahn R, Brunger AT. A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. *J Biol Chem.* 1997;272:4582-4590
70. Fasshauer D. Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochem Biophys Acta.* 2003;1641:87-97
71. Fernandez-Salas E, Hi H, Garay P, Steward LE, Aoki KR. Is the light chain subcellular localisation an important factor in botulinum toxin duration of action? *Mov. Dis.* 2004; 19(Suppl. 8): 23-34
72. Fiebrig KM, Rice LM, Pollock E, Brunger AT. Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat Struct Biol.* 1999;6:117-123
73. Filippi GM, Errico P, Santarelli R, Bagolini B, Manni E. Botulinum A toxin effects on rat jaw muscle spindles. *Acta Otolaryngol* 1993;113:400-404
74. Finsterer J, Fuchs I, Mamoli B. Automatic-guided botulinum toxin treatment of spasticity. *Clin Neuropharm* 1997;3:195-203
75. Fridman A, Crespo M, Argüello et al. Kinematic improvement following Botulinum Toxin-A injection in upper-limb spasticity due to stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010 81:423-427
76. Lock SO, Jones PA, Friend JV et al. Extracellular release of enzymes from macrophages in vitro for measuring cellular interaction with particulate and non-particulate materials. *Toxicol In Vitro.* 1987;1(2):77-83
77. Gelb DJ, Yoshimura DM, Olney RK, et al. Change in pattern of muscle activity following botulinum toxin injections for torticollis. *Ann Neurol.* 1991; 29:370-376

78. Gordon MF, Brashear A, Elovic E, Kassicieh D, Marciniak C, Liu J, Turkel C; BOTOX[®] Poststroke Spasticity Study Group. (2004) Repeated dosing of botulinum toxin type A for upper limb spasticity following stroke. *Neurology*. 63, 1971-1973
79. Göschel H, Wohlfarth K, Frevert J, Dengler R, Bigalke H. (1997) Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies-therapeutic consequences. *Exp Neurol*. 147, 96-102
80. Gracies JM, Wilson L, Gandevia SC, Burke D. Stretched position of spastic muscle aggravates their co-contraction in hemiplegic patients. *Ann Neurol*. 1997; 42(30):707-712
81. Greene P, Fahn S, Diamond B. Development of resistance to botulinum toxin type A in patients with torticollis. *Mov. Disord*. 1994;9, 213-217
82. Gun RA. Botulism: from van Ermengem to the present. A comment. *Rev Infect Dis* 1979;1(4): 720-721
83. Habermann E, Dreyer F, Bigalke H. Tetanus toxin blocks the neuromuscular transmission in vitro like botulinum A toxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1980; 311, 33-40
84. Hambleton P, Cohen HE, Palmer BJ, Melling J. Antitoxin and botulinum toxin treatment. *Br Med J*. 1992; 304, 959-960
85. Harbury PA. Springs and zippers: coiled coils in SNARE-mediated membran fusion. *Structure*. 1998;6:1487-1491
86. Hazzard J, Sudhof TC, Rizo J. NMR analyses of the structure of synaptobrevin and of its interaction with syntaxin. *J Biomol NMR*. 1999;14:203-207
87. Herrmann J, Geth K, Mall V et al. Cilinical Impact of Antibody Formation to Botulinum Toxin A in Children. *Ann Neurol* 2004;55:732-735
88. Homann CN, Wenzel K, Kriechbaum N, Suppan K, Crevenna R, Ivanic G, Dressler D. (2002) Botulinum toxin-the dose controls the poison. A historical sketch *Nervenarzt*. 73, 519-524

89. Hsiung GY, Das AK, Ranawaya R, et al. Long terme efficacy of botulinum toxin A in treatment of various movement disorders over a 10-year period. *Mov Disord.* 2002;17:1288-1293
90. Jankovic J, Orman J. Botulinum A toxin for cranial-cervical dystonia: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology.* 1987; 37, 616-623
91. Jankovic J, Schwartz K. Longitudinal experience with botulinum toxin injections for treatment of blepharospasm and cervical dystonia. *Neurology.* 1993; 43, 834-836
92. Jankovic J, Vuong K.D., Ahsan J. Comparison of efficacy and immunogenicity of original versus current botulinum toxin in cervical dystonia. *Neurology* 2003;60:1186-1188
93. Kanovsky P, Slawek J, Denes Z et al. Efficacy and safety of botulinum neurotoxin NT 201 in poststroke upper limb spasticity. *Clin Neuropharmacol.* 2009; 32(5):259-65.
94. Kessler KR, Skutta M, Benecke R. Long-term treatment of cervical dystonia with botulinum toxin A: efficacy, safety, and antibody frequency. German Dystonia Study Group. *J Neurol.* 1999; 246, 265-274
95. Klein AW. Cosmetic therapy with botulinum toxin, Anecdotal memoirs. *Dermatol Surg* 1996; 22(9):757-759
96. Kranz G, Sycha T, Voller B et al. Neutralizing antibodies in dystonic patients who still respond well to botulinum toxin type A. *Neurology.* 2008 Jan 8;70(2):133-6.
97. Lance JW. Symposium synopsis. In : Feldman RG, Young RR, Koella WP (eds) *Spasticity : disordered control.* Yearbook Medical, Chicago, 1980;pp 485-494
98. Lange DJ, Brin FM, Warner CL, Fahn S, Lovelace RE. Distant effects of local injektion of Botulinum toxin. *Muscle Nerve* 1987;10:552-555
99. Lange O, Bigalke H, Dengler R, Wegner F et al. Neutraliziting antibodies and secondary therapy failure after treatment with botulinum toxin type A: Much ado about nothing? *Clin Neuropharm* 2009; 32(4): 213-218

100. Marion M, Afors K, Sheehy M. Problems of treating writer's cramp with Botulinumtoxin injections: results from 10 years experience. *Rev Neurol (Paris)* 2003; 159: 923-927
101. Marks JD. (2004) Deciphering antibody properties that lead to potent botulinum neurotoxin neutralization. *Mov Disord.* 19, 101-108
102. Meunier FA, Lisk G, Sesardic D, Dolly JO. Dynamics of motor nerve terminal remodeling unveiled using SNARE-cleaving botulinum toxins: the extent and duration are dictated by the sites of SNAP-25 truncation. *Molecular and Cellular Neurosciences* 2003; 22: 454-466
103. Miller FG, Rosenstein DL. The nature and power of the placebo effect. *J Clin Epidemiol.* 2006 ;59 :331-335
104. Misura KM, Scheller RH, Weis WI. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature.*2000;404:355-362
105. Müller K, Mix E, Adib Saberi F, Dressler D, Benecke R. Prevalence of neutralising antibodies in patients treated with botulinum toxin type A for spasticity. *J Neural Transm.* 2009; 116(5):579-85.
106. Naumann M, Toyka KV, Mansouri B et al. Depletion of neutralising resensitivities a secondary non-responder to botulinum A neurotoxin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:954-927
107. Nowakowski A, Wang C, Powers DB, Amersdorfer P, Smith TJ, Montgomery VA, Sheridan R, Blake R, Smith LA, Marks JD. (2002) Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 11346-11350
108. Nussgens Z, Roggenkaemper P. Comparison of two botulinum toxin preparations in the treatment of the essential blepharospasm. *Graefe's Archives of clinical and experimental Ophthalmology* 1997;235:2197-199
109. O'Sullivan GA, Mohammed N, Foran PG, Lawrence GW, Oliver Dolly J. Rescue of exocytosis in botulinum toxin A-poisoned chromaffin cells by expression of

- cleavage-resistant SNAP-25. Identification of the minimal essential C-terminal residues. *J Bio Chem* 1999; 274:36897-36904
110. Olney RK, Aminoff MJ, Gelb DJ, Lowenstein DH. Neuromuscular effects distant from the side of botulinum neurotoxin injection. *Neurology* 1988;38:1780-1783
 111. Oost T, Sukonpan C, Brewer M, Goodnough M, Tepp W, Johnson EA, et al. Design and synthesis of substrate-based inhibitors of botulinum neurotoxin type B metalloprotease. *Biopolymers*. 2003;71:602-619
 112. Ossig R, Schmitt HD, de Groot B, Riedel D, Keranen S, Ronne H, et al. Exocytosis requires asymmetry in the central layer of the SNARE complex. *EMBO J*. 2000;19:6000-6010
 113. Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and Botulinum neurotoxins: Mechanism of action and therapeutic uses. *Phil Trans Royal Soc London Biol Sci* 1999;354(1381):259-268
 114. Probst TE, Heise H, Heise P, Benecke R, Dressler D. Rare immunologic side effects of botulinum toxin therapy: Brachial plexus neuropathy and dermatomyositis. *Mov Disord* 2002;17(suppl. 5):S49
 115. Ranoux D, Gury C, Fondarai J, Mas JL, Zuber M, Respective potencies of Botox® and Dysport® : a double blind, randomized, crossover study in cervical dystonia. *J Neurol Neurosurg Psych* 2002;72:459-462
 116. Rosales RL, Bigalke H, Dressler D. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparations. *Euro Journal of Neurol* 2006;13(suppl. 1) 2-10
 117. Ruban JM, Pellissier de Féligonde O, Benillouche P. Analyse de l'efficacité de la toxine botulique A dans le traitement du blépharospasme et de l'hémispasme facial. 1993 ; *Ophtalmologie (Paris)* 7 :481-482
 118. Sampaio C, Costa J, Ferreira JJ. Clinical comparability of marketed formulations of botulinumtoxin. *Movement Disorders* 2004;19(Suppl. 8):129-136
 119. Sampaio C, Ferreira JJ, Simoes F et al. DYSBOT: a single-blind randomized parallel study of determine wheter any differences can be detected in the efficacy and

- tolerability of two formulations of botulinumtoxin type A- Dysport® and Botox® - assuming a ratio of 4:1. *Mov Disorder* 1997;12:1013-1018
120. Sanders DB, Massey EW, Buckley EG. Botulinum toxin for blepharospasm: single-fibre EMG Studies. *Neurology* 1986;36:545-547
 121. Schellekens H. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(Suppl 6):vi3-vi9
 122. Schmitt A, Dreyer F, John C. At least three sequential steps are involved in the tetanus toxin-induced block of neuromuscular transmission. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1981; 317, 326-330
 123. Schuele S, Jabusch HC, Ledermann RJ et al. Botulinumtoxin injections in the treatment of musician's dystonia. *Neurology* 2005; 64: 341-343
 124. Scott AB, Rosenbaum A, Collins CC. Pharmacologic weakening of extraocular muscles. *Invest Ophthalmol* 1973;12(12):924-927
 125. Scott AB. Development of botulinum toxin therapy. *Dermatol. Clin*. 2004; 22, 131-133
 126. Sesardic D, Jones RG, Leung T, Alsop T, Tierney R. Detection of antibodies against botulinum toxins. *Mov Disord*. 2004 Mar;19 Suppl 8:S85-91
 127. Simpson DM, Gracies JM et al. Assessment: Botulinum neurotoxin for the treatment of spasticity (an evidence-based review) ; *Neurology*. 2008;70(19):1691-8.
 128. Sloop RR, Cole BA, Escutin RO. Reconstituted botulinum toxin type A does not lose potency in humans if it is refrozen or refrigerated for 2 weeks before use. *Neurology*. 1997; 48, 249-253
 129. Smith TJ, Lou J, Geren IN, Forsyth CM, Tsai R, Laporte SL, Tepp WH, Bradshaw M, Johnson EA, Smith LA, Marks JD. Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect Immun*. 2005; 73, 5450-5457
 130. Snow BJ, Tsui JK, Bhatt MH et al. Treatment of spasticity with botulinum toxin : a double-blind study. *Ann Neurol* 1990; 28(4): 512-515

131. SPASM: A European Thematic Network to Develop standardised measures of Spasticity (2005) CREST – Centre for Rehabilitation and Engineering Studies, University of Newcastle, UK
132. Stolze H, Pohle S. Off-Label Use of Botulinumtoxin: Aspects of efficacy and safety. *Akt Neurol* 2006; 33: 275-283
133. Stratmeier J, Lee K, Völker AK et al. Botulinum neurotoxin serotype D attacks neurons via two carbohydrate-binding sites in a ganglioside-dependent manner. *Biochem J*. 2010 Sep 28;431(2):207-16
134. Sugiyama H. Clostridium botulinum neurotoxin. *Microbiol Rev*. 1980; 44(3): 419-48
135. Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 1998;395:347-353
136. Tang J, Maximov A, Shin OH, Dai H, Rizo J, Sudhof TC. A complexin/syntaxin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell*. 2006;126:1175-1187.
137. Tardieu G, Shentoub S, Delarue R. A la recherche d'une technique de mesure de la spasticité. *Revue Neurologique* 1954 ;91 :143-144
138. Tavallaie M, Chenal A, Gillet D, Pereira Y, Manich M, Gibert M, Raffestin S, Popoff MR, Marvaud JC. Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the botulinum neurotoxin A is essential for the generation of protective antibodies. *FEBS Lett*. 2004; 572, 299-306
139. Ting P, Freiman A. The story of Clostridium Botulinum: From food poisoning to Botox. *Clin Med*. 2004;4: 258-261
140. Troung DD, Rontal M, Rolnick M et al. Double-Blind controlled study of botulinumtoxin in adductor spasmodic dysphonia. *Laryngoscope* 1991; 101: 630-634
141. Tsui JK, Bhatt M, Calne S et al. Botulinum toxin in the treatment of writer's cramp: a double-blind study. *Neurology* 1993; 43: 183-185

142. Tsui JK, Eisen A, Stoessl AJ, Calne S, Calne DB. Double-blind study of botulinum toxin in spasmodic torticollis. *Lancet*. 1986; 2, 245-247
143. Turkel CC, Dru RM, Daggett S, Brin MF. Neutralizing antibody formation is rare following repeated injections of a low-protein formulation of botulinum toxin type A (BTX-A) in patients with post-stroke spasticity. *Neurology*. 2002; 58, 316
144. Turner-Stokes L, Ward AB. The management of adult spasticity using botulinum toxin type A – a guide to clinical practice. *Clin Med*. 2002;2(2):128-130
145. van Ermengem E. Classics in infectious diseases. A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. *Rev Infect Dis* 1979;1(4):701-719. (Originally published as “Über einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus” in „Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten“ 1897;26:1-56
146. Veit M, Sollner TH, Rothman JE. Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. *FEBS Lett*. 1996;385:119-123
147. Ward AB. Spasticity treatment with botulinum toxins. 2008;115:607-616
148. Wartenburg R. Pendulousness of the legs as a diagnostic test. *Neurology* 1951;1:18-24
149. Whurr R, Brookes G, Barnes C. Comparison of dosage effects between the American and British botulinum toxin A product in treatment of spasmodic dysphonia. *Mov Dis*. 1995;10:56
150. Wiegand H, Erdmann G, Wellhoner HH. 125I-labelled botulinum A neurotoxin: Pharmacokinetics in cats after intermuscular injection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1976;292:161-165
151. Wissel J. Multiprofessionelles Spastikmanagement mit Botulinum Neurotoxin A. *Nervenheilkunde* 2010;29:201-608
152. Wohlfarth K, Göschel H, Frevert J, Dengler R, Bigalke H. Botulinum A toxins: units versus units. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1997; 355, 335-340.

153. Wohlfarth K, Muller C, Sassin I, Comes G, Grafe S. Neurophysiological double-blind trial of a botulinum neurotoxin type A free of complexing proteins. *Clin Neuropharmacol* 2007 ;30:86-94
154. Wohlfarth K, Schwandt I, Wegner F. et al. Biological activity of two botulinum toxin type A complexes (Dysport® and Botox®) in volunteers. A double-blind, randomized, dose-ranging study. *J Neurol* 2008; 255(12):1932-9
155. Wu HC, Yeh CT, Huang YL, Tarn LJ, Lung CC. Characterization of neutralizing antibodies and identification of neutralizing epitope mimics on the clostridium botulinum neurotoxin type A. *Appl Environ Microbiol.* 2001, 67, 3201-3207
156. Yablon SA, Brashear A, Gordon MF, Elovic EP, Turkel CC, Daggett S, Liu J, Brin MF. (2007) Formation of neutralizing antibodies in patients receiving botulinum toxin type A for treatment of poststroke spasticity: a pooled-data analysis of three clinical trials. *Clin Ther.* 29, 683-690
157. Yoshimura DM, Aminoff MJ, Olney RK. Botulinumtoxin therapy for limb dystonias. *Neurology* 1992;42: 627-630
158. Young RR. Spasticity: a review. *Neurology* 44 1994;44:512-520
159. Zhang Z, Nguyen KT, Barrett EF, David G. Vesicular ATPase inserted into the plasma membrane of motor terminals by exocytosis alkalinizes cytosolic pH and facilitates endocytosis. *Neuron.* 2010 ;68(6):1097-108.
160. Zuber M, Sebald M, Bathien N, de Recondo J, Rondot P. Botulinum antibodies in dystonic patients treated with type A botulinum toxin: frequency and significance. *Neurology.* 1993; 43, 1715-1718

Thesen

1. Botulinumneurotoxin (BoNT) ist ein wirksames, effektives und sicheres Therapeutikum zur Behandlung von Krankheitsbildern, welche mit cholinerg Hyperaktivität einhergehen.
2. Aufgrund der im BoNT enthaltenen Fremdproteine hat die BoNT-Therapie eine immunisierende Wirkung, welche durch die notwendige repetitive Applikation verstärkt wird.
3. Durch die Bildung von neutralisierenden BoNT-Antikörpern (BoNT-nAK) kann es bei einigen Patienten zu einem sekundären Therapieversagen (sTV) kommen, womit die Therapie in ihrer Wirkung limitiert wird.
4. Risikofaktoren für das Auftreten von BoNT-nAK sind hohe BoNT-Einzeldosen, niedrige Injektionsintervalle, Booster-Injektionen und eine niedrige spezifische biologische Aktivität (SBA) des Präparates. Einige Autoren geben als zusätzliche Risikofaktoren das Alter zu Therapiebeginn und die Dauer der Therapie an.
5. Die höchste SBA der auf dem Markt befindlichen BoNT-Präparate hat das komplexproteinfreie BoNT-A Xeomin®. Da es erst seit Januar 2010 für die Behandlung der Spastik der oberen Extremität bei Schlaganfallpatienten zugelassen ist, fehlen bisher Daten zur Effektivität und Sicherheit bei dieser Indikation.
6. Entsprechende Untersuchungen im 1-Jahres-Verlauf im Vergleich zur 3-jährigen Behandlung der Cervicalen Dystonie (CD) sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.
7. Da Patienten mit CD in der Regel jünger sind als die Spastik-Patienten und eine deutlich geringere Dosis an BoNT erhalten, war zu vermuten, dass in der Spastikgruppe mehr Fälle von sTV durch BoNT-nAK auftreten als in der CD-Gruppe.
8. Um die Sicherheit der Behandlung, d.h. das Auftreten von BoNT-nAK zu beurteilen, wurde der Maus-Diaphragma-Test (MDT), welcher derzeit die höchste Sensitivität ($<0,3$ mU/ml) besitzt, verwendet. Zur Objektivierung der Behandlungseffektivität diente die modifizierte Ashworth-Scale (mAs) bei den Spastik-Patienten und der Tsui-Score bei den CD-Patienten.
9. Bei 14,2 % aller Patienten mit Spastik (n=35) wurde ein positiver AK-Titer gefunden, jedoch ein hoher Titer (> 1 mU/ml) nur bei 8,5 % und ein sTV nur bei 2,8 % der Patienten. Von den CD-Patienten (n=47) hatten 17 % einen positiven AK-Titer, davon 6,3 % einen hohen Titer und 2,1 % ein sTV.
10. Die Häufigkeit von BoNT-nAK bei CD und Spastik ist daher nahezu identisch. Somit konnte das Alter als Risikofaktor für das Auftreten von BoNT-nAK ausgeschlossen werden. Die geringfügig höhere Häufigkeit von BoNT-nAK bei CD-Patienten könnte u.a. mit der ausgeprägten Lymphdrainage der Injektionsstellen bei den von der CD betroffenen Muskeln erklärt werden.
11. Kein CD- und Spastik-Patient, der de novo mit Xeomin® behandelt wurde, entwickelte unter der Therapie BoNT-nAK.
12. Eine Umstellung auf Xeomin® von Vorgängerpräparaten (Botox® oder Dysport®) konnte ein sTV nicht verhindern, wenn es schon zu längerfristig erhöhten AK-Titern mit TV gekommen war. Dies lässt auf multiple Epitope des BoNT als Target für nAK schließen.
13. Xeomin® stellte sich in dieser Studie als effektives Therapeutikum sowohl bei der Spastik als auch bei der CD dar. Auch bei Off-label-Injektionen zeigten sich keine unerwünschten Nebenwirkungen und die Wirksamkeit war vergleichbar zu den herkömmlichen BoNT-A-Präparaten.

14. Aufgrund der großen Muskelgruppen der unteren Extremität, die häufig bei Spastik nach Schlaganfall mit betroffen ist, sollte die Zulassung für Xeomin® auf die untere Extremität erweitert werden. Wegen des Fehlens von Komplexproteinen und der dadurch geringeren Immunisierungsgefahr wäre Xeomin® sehr gut geeignet, auch in höheren Dosen eingesetzt zu werden.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit vorher weder in der medizinischen Fakultät der Universität Rostock noch in einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Rostock, Deutschland, Mai 2011

Benjamin Sebastian Frühling

Veröffentlichungen: F.Sterna, U.Müller-Ring, B.Frühling, E.Mix, R. Benecke. Therapieresponse und neutralisierende Antikörper unter der Behandlung mit komplexproteinfreiem Botulinumneurotoxin-A (Xeomin®). Akt Neurol 2011; 38 DOI: 10.1055/s-0031-1276557 (Abstract)

U.Müller-Ring, F.Sterna, B.Frühling, E.Mix, R. Benecke. Wirkungen und Nebenwirkungen einschließlich Antikörperbildung bei Einsatz von Xeomin® zur Behandlung der zervikalen Dystonie. (Posterbeitrag auf dem 2. Deutschen Botulinumtoxin-Kongress 1.-2. Mai 2009 in Rostock)